

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Лимнологический институт Сибирского отделения  
Российской академии наук

На правах рукописи

**КОВАЛЕНКОВА МАРИЯ ВЛАДИМИРОВНА**

Анализ эволюции богатых видами групп байкальских  
беспозвоночных на основании последовательностей интронов генов  
 $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц АТФ-синтазы

**03.02.07 – генетика**

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук,  
профессор Д.Ю. Щербаков

Иркутск – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
Особенности формирования фаун древних озер .....	11
Микроэволюционные процессы и методы их детекции .....	15
Интроны. Особенности эволюции.....	23
Интроны в качестве филогенетических маркеров .....	26
Макрозообентос Байкала.....	32
Особенности биологии <i>Korotnewia semenkewitschi</i> и <i>Gmelinoides fasciatus</i> ...	39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	43
Морфометрические измерения раковин моллюсков.....	43
Экстракция ДНК.....	43
Аmplификация ДНК .....	44
Очистка амплифицированных фрагментов в геле легкоплавкой агарозы .....	46
Анализ нуклеотидных последовательностей .....	47
Реконструкция гаплотипов.....	47
Клонирование ампликонов в плазмидном векторе .....	48
Простирающиеся филогенетические деревья.....	48
Построение филогенетических деревьев.....	49
Тесты на нейтральность мутаций .....	51
Статистическая обработка данных.....	51
Поиск высокоповторенных последовательностей в выборках ридов ценогастропод.....	52

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	53
Филогенетические исследования амфипод надсем. Gammaroidea .....	53
Генетическая структура амфипод <i>Gmelinoides fasciatus</i> в Байкале .....	57
Филогенетическое исследование моллюсков подсем. Baicaliinae .....	66
Выбор маркера молекулярной эволюции .....	66
Интрон гена $\beta$ - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae. Структура диспергированного повтора .....	67
Интрон гена $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы как маркер эволюционных процессов у байкалийн .....	73
Интрон гена $\alpha$ - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae.	75
Объединение генетических, морфологических и экологических признаков моллюсков подсем. Baicaliinae .....	84
Филогеография <i>Korotnewia semenkewitschi</i> в Байкале .....	86
Таксономический статус <i>P. michelae</i> sp. n. ....	92
Филогенетическое исследование полихет рода <i>Manayunkia</i> .....	94
Заключение.....	103
ВЫВОДЫ .....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	125

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Изучение механизмов формирования и поддержания современного биоразнообразия не только является одной из ключевых задач генетики, но и имеет большое практическое значение в контексте мониторинга состояния окружающей среды и рационального природопользования.

Озеро Байкал — крупнейший в мире резервуар пресной воды, в котором сосредоточено около 20% всех запасов пресной воды, как и ряд других древних озер, населено исключительно разнообразной фауной, при этом более половины всех обитающих в Байкале видов животных — эндемики (Тимошкин, 2001).

Исследование микроэволюционных процессов в популяциях бентосных беспозвоночных приобретает большое значение, поскольку в течение последнего пятилетия в литоральной зоне озера Байкал отмечаются стремительные изменения бентосных сообществ (Кравцова и др., 2012; Kravtsova et al., 2014; Тимошкин и др., 2014; Timoshkin et al., 2016). Для прогнозирования возможных изменений экосистемы в целом, необходимо иметь сведения об исходном состоянии и масштабах естественных эволюционных процессов, происходящих в озере.

Несмотря на то, что Байкал — древнейшее из всех существующих озер, время дивергенции большинства его обитателей относительно невелико, что затрудняет исследование их филогенетических отношений (Sherbakov, 1999). Филогенетические построения, основанные на единичных молекулярных маркерах, могут значительно исказить эволюционную картину для «молодых» таксономических групп. Для получения наиболее полной информации о процессах видообразования необходимо применение по возможности большего числа несцепленных и достаточно вариабельных генетических маркеров.

Сплайсосомные интроны получили достаточно широкое распространение в качестве таких маркеров (Reisser et al., 2011; David et al., 2016; Colgan, 2018). Однако существует ряд ограничений их применения в филогенетических исследованиях: небольшое количество доступных универсальных праймеров для амплификации, большая изменчивость длин интронов, отличия в скоростях накопления замен у разных таксонов и регуляторные функции интронов.

Чтобы исследовать особенности эволюции и соответственно возможность применения интронных фрагментов для решения разных эволюционных задач, были выбраны три группы байкальских беспозвоночных, которые отличаются по экологическим характеристикам и времени дивергенции этих групп в Байкале: амфиподы надсем. Gammaroidea (Latreille, 1802), моллюски подсем. Baicaliinae (Fisher, 1885), полихеты рода *Manayunkia* (Bourne, 1883) (Зубаков и др., 1997; Камалтынов, 2001; Пудовкина и др., 2015).

### **Цели и задачи исследования**

Цель работы – исследовать особенности эволюции нуклеотидных последовательностей интронов генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц АТФ-синтазы байкальских беспозвоночных, оценить их пригодность в качестве филогенетических маркеров для богатых видами групп байкальских беспозвоночных. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование возможности применения интронных маркеров для уточнения филогенетических отношений байкальских эндемиков: амфипод надсем. Gammaroidea, полихет рода *Manayunkia*, моллюсков подсем. Baicaliinae и изучения внутривидового генетического разнообразия амфипод *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing, 1899);
2. Выяснение эволюционных историй модельных групп полихет, моллюсков, амфипод с помощью сравнения деревьев, построенных на

основании разнородных данных - нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров ядерной и митохондриальной локализации, а также морфологических признаков;

3. Объединение морфологических, экологических и генетических данных моллюсков подсем. Baicaliinae для получения наиболее полной картины эволюции представителей подсемейства.

### Научная новизна работы

Впервые охарактеризован полиморфизм интронных последовательностей на межвидовом уровне – у амфипод надсем. Gammaroidea, моллюсков подсем. Baicaliinae и полихет рода *Manayunkia*, и внутривидовом – у амфипод *G. fasciatus* и моллюсков *Korotnewia semenkewitschi* (Lindholm, 1909). Показано, что последовательности интронов генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц АТФ-синтазы по уровню полиморфизма сопоставимы с другими быстро эволюционирующими генетическими маркерами (CO1 и ITS-1). Разрешающая способность филогенетического анализа на основании интронных маркеров зависит от возраста и эволюционной истории анализируемых групп: для эволюционно более молодых групп – байкальских полихет и моллюсков – затруднено использование последовательностей интронов для видовой идентификации.

В ходе работы впервые за последние 40 лет обнаружен и описан новый для науки вид моллюсков подсем. Baicaliinae — *Pseudobaikalia michelae* sp. n., который является эндемиком озера Байкал. Впервые получены подтверждения интрогрессии у гастропод сестринских видов рода *Pseudobaikalia* (Lindholm, 1909) и у подвидов *K. semenkewitchii*.

В библиотеках ридов трех видов байкалийн и в интроне гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы обнаружен ретротранспозон лишь частично схожий с ретротранспозонами семейства MESC, широко распространенными у двустворчатых и брюхоногих моллюсков.

### Научно-практическое значение

Результаты диссертационной работы расширяют уже имеющиеся сведения о механизмах эволюции «букетов видов» байкальских беспозвоночных. Полученные данные полезны для проведения таксономической ревизии моллюсков подсемейства *Baicaliinae* и амфипод надсем. *Gammaroidea*, а также для моделирования микроэволюционных процессов гибридизации и интрогрессии. Нуклеотидные последовательности обнаруженного мобильного элемента возможно использовать для поиска сходных структур в геномах животных и анализа эволюции SINE-элементов. Полученные материалы используются в учебных программах биолого-почвенного факультета Иркутского государственного университета и вошли в учебное пособие для бакалавров и магистров «Актуальные проблемы современной генетики: биоинформационные методы анализа биоразнообразия».

### Положения, выносимые на защиту:

1. Нуклеотидные последовательности единственных интронов генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц АТФ-синтазы амфипод надсем. *Gammaroidea* и моллюсков подсем. *Baicaliinae* являются нейтральными маркерами, эволюционирующими со скоростью, сопоставимой со скоростью митохондриальных (CO1 и 16S рРНК) и быстрых ядерных маркеров (ITS-1).
2. Полиморфизм интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы отражает существование в Байкале двух не полностью изолированных групп амфипод *Gmelinoides fasciatus*, что отчасти соответствует внутривидовой изменчивости фрагмента митохондриальной ДНК (CO1) и географическому распределению популяций этого вида в озере.
3. Межвидовая интрогрессия оказала существенное влияние на формировании видového разнообразия эндемичных байкальских моллюсков подсем. *Baicaliinae*.

### **Апробация работы и публикации**

Результаты работы представлены: на VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «СИМБИОЗ-РОССИЯ» (2013 г., г. Иркутск, Россия); на III Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (2013 г., г. Улан-Удэ, Россия); на 4-й Международной конференции «Molecular Phylogenetics-4» (2014 г., г. Москва, Россия), на 6-й Международной Верещагинской Байкальской Конференции (2015 г., г. Иркутск, Россия), на 8-ом международном симпозиуме MAPEEG-2015 (2015 г., г. Владивосток, Россия), на 10-й Международной конференции BGRS\SB-2016 (2016 г., г. Новосибирск, Россия).

### **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность старшему научному сотруднику лаборатории водных беспозвоночных, д.б.н. Ситниковой Т.Я., а также всем коллегам лаборатории геносистематики за ценные консультации и поддержку на всех этапах подготовки диссертационной работы.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список цитируемой литературы (190 источников) и приложение; изложена на 137 страницах, содержит 9 таблиц и 42 рисунка.

### **Список публикаций**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 в рецензируемых журналах.

Статьи:



1. **Коваленкова М. В.**, Ситникова Т. Я., Щербаков Д. Ю. Генетическая и морфологическая диверсификации гастропод семейства Baicaliidae // Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11. № 4.
2. Sitnikova T., **Kovalenkova M.**, Peretolchina T., Sherbakov D. A new, genetically divergent species of *Pseudobaikalia* Lindholm, 1909 (Caenogastropoda, Baicaliidae) // ZooKeys. – 2016. № 593. – P. 1.
3. Щербаков Д. Ю., **Коваленкова М. В.**, Майкова О. О. Некоторые результаты молекулярно-филогенетических исследований байкальских эндемичных беспозвоночных // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т. 20. № 4. – С. 404-407.

Научные пособия и сборники:

4. Коваленкова М.В., Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю. Несоответствие филогенетических сигналов ядерного и митохондриального молекулярных маркеров для полихет р. *Manayunkia* // Актуальные проблемы науки Прибайкалья. Вып. 1. 2015. С. 144-148.
5. Актуальные проблемы современной генетики: биоинформационные методы анализа биоразнообразия: Учебное пособие / Д. Ю. Щербаков, Р.В. Адельшин, М.В. Коваленкова. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2018. – 119 с.

Тезисы конференций:

6. Коваленкова М. В. Филогенетические взаимоотношения байкальских гастропод эндемичного семейства Baicaliidae (Clessin, 1878) // Материалы XX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва, 2013. С. 84.
7. Коваленкова М. В., Ситникова Т. Я., Щербаков Д. Ю. Применение интронного полиморфизма для уточнения филогенетических отношений моллюсков сем. Baicaliidae (Clessin, 1878) // VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «СИМБИОЗ-РОССИЯ». Иркутск, 2013. С. 154.
8. Коваленкова М.В., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю. Описание диспергированного повтора моллюсков сем. Baicaliidae (Fischer, 1885) // 17-я

Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пушино, 2013. С. 202.

9. Коваленкова М.В., Камалтынов Р.М., Щербаков Д.Ю. Интрон гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы как маркер эволюции байкальских амфипод // Материалы III Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы». Улан-Удэ, 2013. С. 9-10.

10. Kovalenkova M.V., Pudovkina T.A., Sitnikova T.Ya., Sherbakov D.Yu. Genetic polymorphism of ATP-synthase  $\alpha$ -subunit gene intron in Baikalian polychaetes of the genus *Manayunkia* (Sedentaria, Sabellidae) // Molecular phylogenetics: Contributions to the 4<sup>th</sup> Moskow International Conference “Molecular Phylogenetics”. Moscow, 2014. Pp. 29-30.

11. Kovalenkova M.V., Petunina J.V., Sherbakov D.Y. Nuclear and mitochondrial polymorphism in baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* // Modern achievements in Population, evolutionary and ecological genetics International symposium Abstracts, Vladivostok, 2015. P. 42.

12. Kovalenkova M.V., Sitnikova T.Y., Sherbakov D.Y. Phylogenetic position of a new species of caenogastropods of the subfamily Baicaliinae (Mollusca: Littorinimorpha: Rissoidae) // VIth Vereshchagin Baikal Conference: abstracts, Irkutsk, 2015. P. 121.

13. Kovalenkova M.V., Petunina Zh.V., Sherbakov D.Yu. Incongruent nuclear and mitochondrial genetic structure in baikalian amphipods *Gmelinoides fasciatus* // 10<sup>th</sup> International Conference On Bioinformatics Of Genome Regulation And Structure\Systems Biology. Novosibirsk, 2016. P. 146.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Особенности формирования фаун древних озер

Древними называют озера, возраст которых превышает 1 млн. лет.

Глубина большинства таких водоемов превышает сотни метров, поскольку накопление осадков может привести к исчезновению мелкого водоема за длительный период времени (Cristescu et al., 2010).

Главным признаком, объединяющим все такие водоемы, кроме их возраста и глубин, является чрезвычайное богатство фаун и высокий процент их эндемизма, благодаря которым древние озера получили название «горячих точек видообразования» (Brooks, 1950; Martens, 1997).

Одновременно с этим, древние озера представляют собой изолированные от сходных местообитаний системы, имеющие не слишком много внутренних барьеров. Именно эти особенности делают их важными объектами для изучения симпатрического видообразования.

Какой-либо уникальный для древних озер механизм формирования биоразнообразия не был обнаружен. При этом отмечается общая для многих групп животных из различных озер чрезвычайно высокая скорость видообразования (Martens, 1997).

В соответствии с теорией симпатрического видообразования адаптации и действующий на них отбор могут иметь большее значение для дивергенции видов, чем географическая изоляция. Однако само существование симпатрического видообразования долгое время вызывало споры и критику, из-за трудностей в поиске доказательств главенствующего влияния экологических факторов на расхождение видов (Jiggins, 2006; Bolnick, Fitzpatrick, 2007). Поскольку естественный отбор способствует формированию адаптаций к различным экологическим условиям вне зависимости от наличия или отсутствия географических барьеров, а экологические факторы, способствующие репродуктивной изоляции чрезвычайно многообразны, они зачастую оказываются неисследованными, в

то время как географической изоляции уделяется больше внимания (Jiggins, 2006; Coyne, 2007). Во многих исследованиях акцент делается именно на географическое распространение популяций или видов, а не на поиск факторов, обусловивших репродуктивную изоляцию.

Из всех древних озер только для Танганьики и Титикаки известны недавние (от нескольких миллионов до нескольких тысяч лет назад) значительные колебания уровня воды, которые могли привести к разделению водоема на несколько меньших по размеру (Verheyen, 2003; Mourguiart, 2000). В то же время известно, что отсутствие географических барьеров может компенсироваться низкой способностью видов к расселению. Например, на островах Зеленого Мыса был обнаружен букет пятидесяти видов моллюсков-конусов, каждый из которых чаще всего встречается только на одном острове, или даже отдельной бухте (Duda, Rolán, 2005). Сходные результаты получены для совместно-обитающих видов цихлид Танганьики, строящих гнезда на каменистом грунте: песчаная бухта длиной в 70 км является репродуктивным барьером для видов, обладающих меньшей подвижностью, в то время как у более подвижных видов изоляция отсутствует (Sefc et al., 2007).

Видообразование, связанное с микрогеографическими компонентами (например, мозаичностью субстратов) или конкуренцией за структурированный ресурс, принято называть парапатрией или «микроаллопатрией» (Stelbrink et al., 2016). А необходимым условием для симпатрического видообразования на данный момент считается высокий уровень внутривидовой конкуренции за неструктурированный ресурс (Dieckmann, Doebeli, 1999). Результаты моделирования ассортативного скрещивания в популяциях использующих неструктурированный ресурс позволяют предполагать возможность видообразования в результате действия только полового отбора (Dieckmann, Doebeli, 1999; Getz et al., 2016).

В подтверждение этого для наиболее известных примеров симпатрических комплексов видов эндемичных цихлид из Великих

Африканских озер или Дарвиновских вьюрков было показано, что важную роль играет именно половой отбор и трофические адаптации (Seehausen et al., 2008; Lamichhane et al., 2016).

Стремительные темпы видообразования приводят к формированию так называемых «букетов видов» (Brooks, 1950). Этот термин начал применяться относительно богатых видами монофилетичных групп организмов из древних озер.

Обнаружение таких групп видов считается более вероятным в относительно изолированных экосистемах, таких как островные архипелаги или озера; и маловероятным — например, в океане. Однако арктический и антарктический шельфы также характеризуются как «генераторы букетов видов» (Lecointre et al., 2013).

Для определения группы видов как «букета» необходимо соблюдение ряда условий: группа должна быть монофилетичной, содержать большое количество морфологически и экологически отличных видов, занимать некоторую достаточно изолированную от сходных местообитаний территорию и обладать высоким процентом эндемизма. Зачастую для таких групп крайне затруднительным бывает установление порядка дивергенции из-за высоких темпов видообразования (Lecointre et al., 2013).

В большинстве древних озер присутствуют букеты видов (Рис. 1), принадлежащие разным таксонам, при этом чаще всего возраст таких букетов оказывается значительно меньше возраста самих озер (Sherbakov, 1999).

Одним из вероятных путей формирования букетов видов представляется колонизация водоема с последующей стремительной симпатрической радиацией, несмотря на достаточно длительное существование генетического потока между родственными видами (Seehausen, 2006). При этом зачастую букет видов дает только один из ряда экологически сходных таксонов: например, в нескольких озерах Латинской Америки букеты видов сформировали карпозубики (*p. Cyprinodon*), а не гамбузии, занимающие ту

же экологическую нишу, но обладающие меньшей морфологической пластичностью (Seehausen, 2006; Losos, 2010; Martin, Wainwright, 2011).

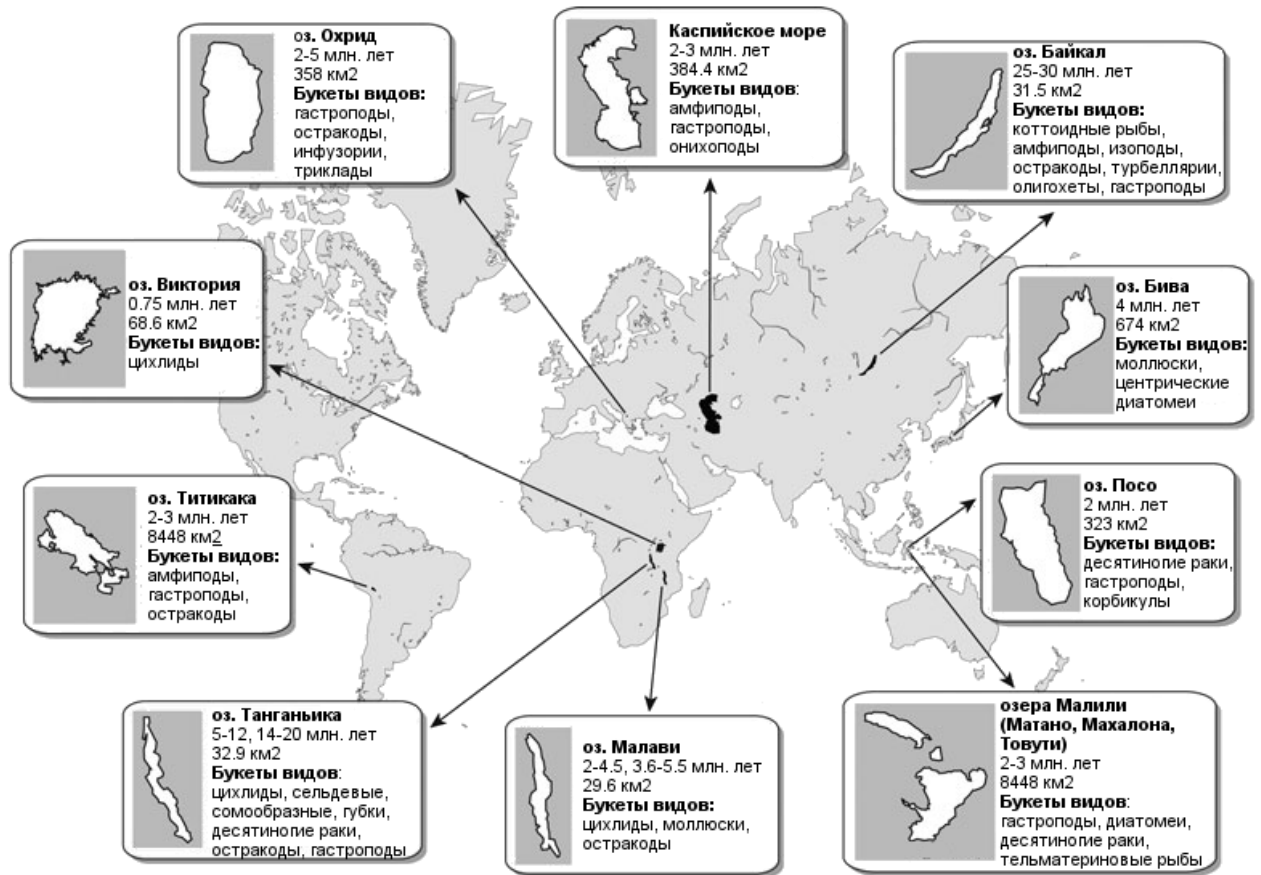


Рис. 1. Эндемичное биоразнообразие и физические характеристики основных древних озер мира (по данным из статьи Cristescu et al. 2010).

При этом для некоторых из древних озер предполагаются значительные климатические колебания или геологические события, которые могли способствовать вымиранию фаун и стремительному освобождению множества экологических ниш, с последующим их заселением близкородственными видами.

К таким факторам также можно отнести, например, оледенения антарктического шельфа, ураганы на островных архипелагах или крупные тектонические перестройки в рифтовых озерах. Например, диспропорция в видовом разнообразии древнего озера Киву (ок. 20 млн. лет) и более молодого озера Виктория (ок. 20 тыс. лет) может быть объяснена тем, что недавно эти водоемы контактировали через речную сеть. Позднее фауна

Киву могла пострадать в результате поднятия метана и углекислого газа донных осадков, а также вулканической активности (Verheyen et al., 2003).

В любом случае, очевидно, что видовое разнообразие фаун древних озер не является результатом постепенного накопления в экосистеме разных видов, а формируется в ходе взаимодействия множества микропопуляционных процессов: вымираний, экспансий, интрогрессий. Одним из интересных следствий симпатрии является возможность гибридизации между близкородственными видами, то есть видообразование при наличии потока генов (Smadja, Butlin, 2011).

### **Микроэволюционные процессы и методы их детекции**

Межвидовая гибридизация играет очень важную роль в формировании видового разнообразия и может приводить как к уменьшению (Kleindorfer et al., 2014), так и к увеличению количества видов (Abbott et al., 2013; Mejer et al., 2017), а, следовательно, и к изменению экосистем в целом (Harmon et al., 2009).

Изменение условий обитания зачастую приводит к нарушению межвидовых репродуктивных барьеров, что может привести к слиянию видов, как это происходит на данный момент с одной из известнейших видовых радиаций – дарвиновскими вьюрками или ранее с цихлидами озера Виктория (Grant, Grant, 2014; Kleindorfer et al., 2014; Seehausen et al., 2008).

В то же время считается, что гибридизация может служить как дополнительный и, возможно, более распространенный, чем мутации, источник генетических адаптаций (Whitney et al., 2010; Kunte et al., 2011; Lamichhane et al., 2018). Этот процесс получил название «адаптивная интрогрессия» и может способствовать формированию гибридных видов.

Например, предполагается, что изменения уровня воды в озере Малави способствовали сначала изоляции, а затем нарушению репродуктивного барьера и интрогрессии митохондриального генома между разными линиями

цихлид что, вероятно, привело к формированию группы видов, занявших другую экологическую нишу (Genner, Turner, 2011; Joyce et al., 2011). Кроме того, высказано предположение, что чем больше прошло времени с момента расхождения видов цихлид, тем больше появляется у гибридного потомства новых признаков, отсутствовавших у обоих родителей (Stelkens et al., 2009). При этом показано, что количество генов, обуславливающих генетическую несовместимость, при равномерном темпе молекулярной эволюции будет увеличиваться пропорционально квадрату времени, прошедшего с момента разделения популяций или видов, подобно «снежному кому» (Matute et al., 2010).

При исследовании хромосомных перестроек большого количества видов воробьиных птиц, было установлено, что хромосомные инверсии достоверно чаще обнаруживаются у совместно обитающих видов (Hooper, Price, 2017). Скорее всего, инверсии препятствуют рекомбинации и обмену генетическим материалом, даже если гибридизация происходит регулярно, как, например, было показано в случае серой и черных ворон (Poelstra et al., 2014). Во время ледникового периода две группы птиц были изолированы друг от друга. В одной из групп произошла инверсия около 2 млн. л.п. (менее 1% генома), сформировав «суперген», на котором аннотированы около 40 белок-кодирующих генов. Один из генов, оказавшихся в инвертированном участке, участвует в пигментации оперения, также там располагаются гены цветового восприятия, и гены гормональных пептидов и рецепторов, участвующих в процессах мотивации, обучения, формирования социального поведения. В инвертированном участке не только накопились нуклеотидные отличия, но также изменился уровень экспрессии генов. В результате обеспечивается существование обособленных форм, несмотря на вторичную симпатрию. Описанный пример, вероятно, является идеальным случаем «геномного островка видообразования», когда виды мало отличаются по большинству генетических маркеров, но в то же время, существует небольшое количество локусов, отличающихся сильно.



Для двух симпатрических экоморф цихлид, обитающих в одном из маленьких кратерных озер Танзании, было показано, что «островки видообразования» содержат гены, участвующие в зрительном восприятии (например, родопсин), гормональной регуляции и морфогенезе (Malinsky et al., 2015; Martin et al., 2015).

Исследование различных локусов позволяет не только выявить признаки, подверженные действию отбора, но и изучать эволюционную историю видов. Маркером гибридизации и интрогрессии может служить несоответствие между филогенетическими деревьями, построенными на основании разных генетических локусов, однако отличить именно интрогрессию от сохранения предкового полиморфизма бывает затруднительно. Кроме того, геномная гетерогенность может быть следствием и ряда других факторов: фонового отбора или «селективного подметания» («selective sweep»), различий в скоростях закрепления мутаций и рекомбинации. Различить эти эволюционные сценарии и оценить их вероятности возможно с помощью компьютерного моделирования популяционных и видовых выборок с необходимыми характеристиками (Joly, 2012).

Рядом авторов было показано, что относительно недавние демографические и эволюционные процессы, оставляют след на нуклеотидном полиморфизме популяций (Fay, Wu, 2000; Ramos-Onsins, Rozas, 2002). Например, экспоненциальное увеличение численности может быть определено по форме филогенетического дерева: генная генеалогия в таком случае растянута ближе к внешним узлам и сжата у корня («звездообразная филогения»). Распределение попарных генетических дистанций соответственно также позволяет детектировать подобные события: для растущих популяций ожидается форма распределения, тяготеющая к большим дистанциям (логнормальное распределение), чем в случае сохранения постоянной численности (экспоненциальное распределение) (Slatkin, Hudson, 1991) (Рис. 2). Полимодальное

распределение генетических дистанций можно ожидать в случае дизруптивного отбора, или при наличии изолированных популяций.

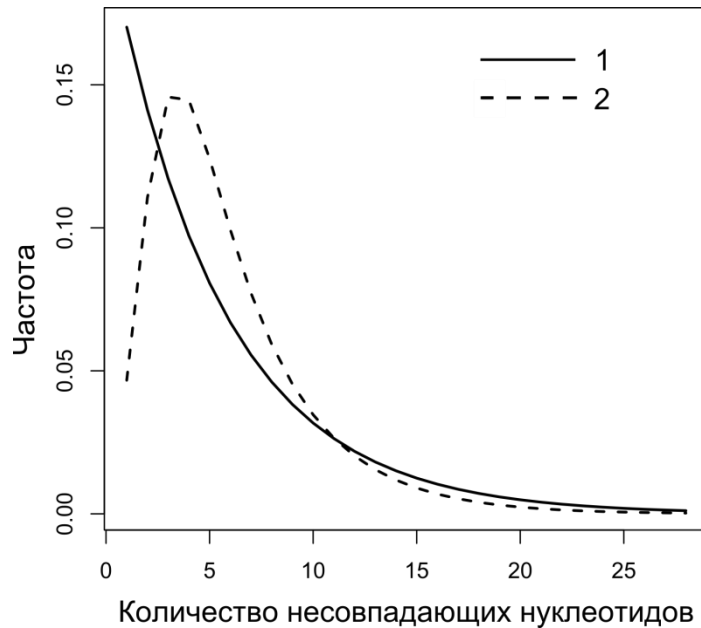


Рис. 2. Количество несовпадающих сайтов между аллелями в популяции ожидаемое при постоянной численности (1); росте численности (2).

Размах и характер генетической изменчивости в существующей популяции длительное время находятся под действием ряда эволюционных сил: отбора, миграций, дрейфа генов и мутаций (Hedrick, 2011). В простой ситуации генетическая вариация нейтрального локуса изолированной популяции с постоянной численностью определяется вкладом новых возникающих мутаций, увеличивающих разнообразие, и дрейфа генов, его снижающего. В условиях такого дрейф-мутационного равновесия размер генетической вариабельности популяции ( $\theta\pi$ ) постоянен и определяется следующей формулой:

$$\theta = 4N_e \lambda, \text{ — для диплоидных генетических маркеров и}$$

$$\theta = N_e \lambda, \text{ — для гаплоидных маркеров,}$$

где  $\lambda$  — мутационная скорость на поколение на локус. Эффективный размер популяции ( $N_e$ ) или общее количество особей, принимающих участие в размножении — один из важнейших параметров популяций, используемых в экологии и эволюционной биологии. Однако вычисление этого параметра

очень осложняется стохастической природой таких процессов как инбридинг и генетический дрейф, сильно влияющих на него.

Кроме того,  $\theta$  может быть рассчитана и другими способами:

1) через число сегрегирующих сайтов ( $S$ ) (Watterson, 1975):

$$\theta_S = \frac{S}{\sum_{j=1}^{n-1} \frac{1}{j}},$$

где  $n$  – количество гаплотипов,

$j$  –  $j$ -ый гаплотип,

а  $n-1$  – гармоническое число (сумма обратных величин). Такой расчет основывается на коалесцентной теории;

2) через величину ожидаемой гетерозиготности ( $H_e$ ) (Zouros, 1979; Chakraborty, Weiss, 1991):

$$\theta_H = \frac{H_e}{1-H_e}, \text{ где } H_e = 1 - \sum p_j^2, \text{ где } p_j - \text{ частота встречаемости } j\text{-ого}$$

гаплотипа;

3) через нуклеотидное разнообразие ( $\pi$ ) (Tajima, 1983):

$$\theta_\pi = \pi$$

Сравнение параметра  $\theta$ , рассчитанного различными способами, несет важную информацию о популяционной истории, на этом основаны несколько тестов на нейтральность эволюции: тест Таджимы (Tajima, 1989), H-тест (Fay, Wu, 2000), и R2 (Ramos-Onsins, Rozas, 2002). К другой группе тестов, основанных на информации о распределении частот аллелей, относится Fs-тест (Fu, 1997).

Тест D Таджимы рассчитывается, как разность между нуклеотидным разнообразием и значением тета, вычисленным через количество сегрегирующих сайтов:

$$D = \theta_\pi - \theta_S / \sqrt{\text{var}(\theta_\pi - \theta_S)},$$

где  $\text{var}(\theta_\pi - \theta_S)$  – оценка стандартной ошибки отличий между двумя величинами. Если значение D достоверно положительно можно предполагать недавнее прохождение популяцией через «бутылочное горлышко» или

действие балансирующего или дизруптивного отбора, если значение  $D$  достоверно отрицательно можно предполагать рост популяционной численности или действие движущего или стабилизирующего отбора.

О действии «селективного подметания» или эффекта генетического «хичхайкинга» свидетельствуют достоверно отрицательные значения  $H$ -теста (Fay, Wu, 2000). Значение  $H$ -теста также вычисляется как разность между параметром  $\theta$ , оцененным разными способами:

$$H = \theta_{\pi} - \theta_H,$$

где  $\theta_H$  вычисляется через расчет дистанций до ближайшего общего предка, таким образом, для проведения теста необходимо использовать аут-группу (представителя какого-либо родственного вида). Достоверно положительные значения  $H$  свидетельствуют о дефиците высоко- и среднечастотных полиморфизмов по отношению к равновесным ожиданиям, в то время как достоверно отрицательные значения  $H$  говорят об избытке гаплотипов имеющих однонуклеотидные полиморфизмы. Тестирование различных сценариев показывает, что избыток высокочастотных аллелей чаще будет возникать в случае «хичхайкинга», чем в результате прочих сценариев. Однако такие значения  $H$ -теста могут быть получены и в случае, если сильно отличающиеся популяции обмениваются редкими мигрантами и однонуклеотидный полиморфизм, таким образом, будет встречаться часто или редко.

Для детекции популяционной экспансии используется тест Рамос-Онсинса и Розаса следующего вида:

$$R2 = \frac{(\sum_{i=1}^n (U_i - \frac{k}{2}))^{12}}{S},$$

где  $n$  – размер выборки,

$S$  – общее количество сегрегирующих сайтов,

$k$  – среднее количество нуклеотидных отличий между двумя последовательностями,

$U_i$  – количество аутапоморфий в последовательности  $i$ .

Этот тест основан на том, что ожидаемое количество аутапоморфий на ветвях генеалогии после стремительного роста популяции будет равно  $k/2$ , следовательно, близкие к нулю значения этого теста будут наблюдаться в случае такого демографического сценария.

$F_s$ -статистика также как тест Таджимы позволяет отличить нейтральную эволюцию маркера от влияния разных демографических событий. Значение  $F_s$ -статистики основывается на сведениях о распределении частот аллелей и вычисляется по следующей формуле:

$$F_s = \ln \left( \frac{s}{1-s} \right),$$

где  $S$  – вероятность наблюдения популяции с числом аллелей равным или меньшим, чем наблюдаемое значение при известном уровне разнообразия и допущении, что все аллели селективно нейтральны:

$$S = \Pr (k \geq k_{\text{obs}} | \theta = \theta\pi).$$

Поскольку тест основывается на коалесцентных симуляциях, статистически значимым считается только вероятность менее 0.02. Достоверно отрицательные значения, сходно с D-тестом, будут указывать на экспансию или действие отбора на маркерную последовательность или смежные с ней (явление генетического «хичхайкинга»). Положительные значения  $F_s$  являются свидетельством прохождения через «бутылочное горлышко» или действие балансирующего отбора.

Ранее было показано, что  $R_2$  и  $F_s$  тесты являются наиболее мощными для выявления роста популяций в выборках различных размеров и прочих характеристик (Ramos-Onsins, Rozas, 2002). Более того,  $R_2$  чувствителен даже к незначительному росту при малом количестве образцов. Поскольку  $R_2$  и  $F_s$  используют разные данные для расчета, несоответствие между тестами также может быть источником ценной информации о действии прочих эволюционных процессов, например, рекомбинации. Однако позднее

отмечалась меньшая чувствительность  $F_s$ -теста к действию отбора (Garrigan et al., 2009).

Для аутосомных маркеров важной популяционной характеристикой является наблюдаемая гетерозиготность, и ее сравнение с ожидаемой в случае соблюдения равновесия Харди-Вайнберга, согласно которому количество гетерозигот в популяции зависит от количества и частот уникальных аллелей. В том случае, если наблюдаемая гетерозиготность оказывается ниже ожидаемой, то можно говорить об относительной изоляции и повышении коэффициента инбридинга (т.е. близкородственных скрещиваний); а в противном случае более вероятен вторичный контакт между некогда изолированными популяциями или селективный отбор благоприятствующий гетерозиготам (балансирующий или уравнивающий).

Уровень нуклеотидного разнообразия по характеру его интерпретаций сходен с ожидаемой гетерозиготностью и позволяет делать предположения относительно структуры или даже демографической истории популяций. Например, низкий уровень полиморфизма может свидетельствовать о маленьком эффективном размере популяции или недавнем его резком снижении (эффект «бутылочного горлышка»), в то время как высокий уровень может свидетельствовать как о высокой или стабильной численности, так и о пространственной подразделенности и изоляции субпопуляций (Hedrick, 2011).

Изучение генетической изменчивости в масштабе ареала вида помогает оценить относительную роль эффекта основателя и прохождения популяции через «бутылочное горлышко», вследствие которых наблюдается случайное колебание генетической изменчивости, так, что частота аллелей отличается от частот в исходной предковой популяции. В первом случае популяция произошла от исходного малого количества особей, а во втором в определенном поколении в процессе эволюции популяции выжило небольшое число особей. Также можно оценить влияние генетического

дрейфа, популяционной экспансии и различных других событий на формирование географических паттернов генетической изменчивости. Молекулярные данные могут показать сходство между популяциями одной волны расселения и с учетом данных по генетическому разнообразию помочь определить местоположение вероятного рефугиума.

Разные не сцепленные между собой геномные локусы могут иметь различные генеалогические истории в результате разных скоростей накопления мутаций, генетического дрейфа и действия отбора (Rosenberg, Nordborg, 2002), что делает необходимым применение эволюционно нейтральных генетических маркеров.

### Интроны. Особенности эволюции

Особенности эволюции интронов тесно связаны с их функциями, важнейшей из которых является сплайсинг. К сайтам, необходимым для правильного вырезания интронов, относятся: донорный и акцепторный сайты, полипиримидиновый тракт и «точка ветвления», а также цис-элементы экзонов (Рис. 3). Консервативность каждого из элементов может варьировать в зависимости от таксономической группы, специфичности гена, и размера его функциональных областей (Irimia, Roy, 2008).

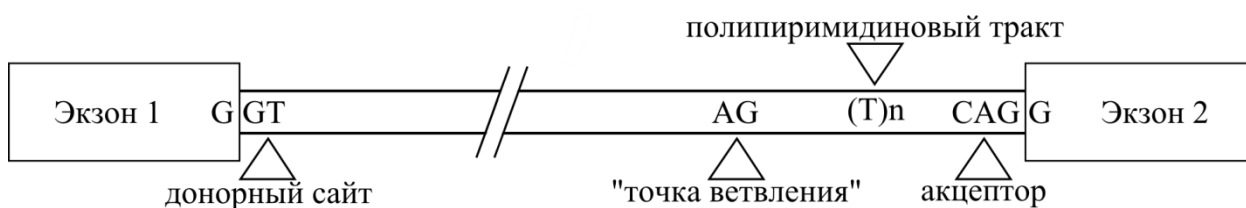


Рис. 3. Схематичное изображение расположения функциональных сайтов сплайсосомных интронов эукариот.

В организмах с небольшим количеством интронов последовательность точки ветвления интрона (А-сайт, с которым связывается донорный сайт при сплайсинге) обычно наиболее консервативна и, напротив, зачастую бывает вырождена у интрон-богатых организмов (Irimia, Roy, 2008). Например, у

*Caenorhabditis elegans* отсутствует строгая комплементарность точки ветвления и малой ядерной РНК (мяРНК) U2, хотя последние 8 нуклеотидов интрона высококонсервативны и связываются компонентами рибонуклеопротеина U2AF (Hollins et al., 2005).

У дрожжей *S. cerevisiae* отсутствует ортолог мяРНК U2AF35 и интроны лишены политимидинового тракта, однако точка ветвления имеет более протяженную гомологию с мяРНК U2 (UACUAAC), чем обычно у интрон-богатых организмов (Wentz-Hunter, Potashkin, 1995).

Зачастую у интрон-богатых таксонов наиболее консервативными оказываются донорный и акцепторный сайты сплайсинга, а более изменчивыми – политимидиновый тракт и точка ветвления.

Эффективность сплайсинга интронов зависит от длины: длинные интроны требуют больше регуляторных мотивов, специфики хроматинового ландшафта и кинетики полимеразной реакции (Hertel, 2008; Yu et al., 2008; Chen et al., 2010), а для коротких интронов главенствующую роль играют распознавание 5'- и 3'- сайтов сплайсинга. При этом против сайтов сходных с сайтами сплайсинга находящихся внутри интрона действует очищающий отбор, который усиливается в коротких интронах (Farlow et al., 2011).

В геноме человека первые интроны обычно длиннее и более GC-богаты, в частности богаты CpG-островками, а также чаще содержат ТАТА и СААТ-мотивы, чем другие интроны (Li et al., 2012). Сходные особенности обычно отмечаются и у тканеспецифичных генов.

Сравнение более двухсот интронов *Drosophila melanogaster* и *D. simulans* показало, что вне зависимости от положения интрона в гене, короткие (менее 1000 п.н.) и АТ-богатые интроны более изменчивы на межвидовом уровне (коэффициенты корреляции между длиной интрона и его изменчивостью и между АТ-составом интрона и его изменчивостью:  $R = 0.39$ ,  $p < 10^{-4}$  и  $R = 0.35$ ,  $p < 10^{-4}$ , соответственно) (Haddrill et al., 2005). Благодаря чему, предложено использовать короткие интроны *D. melanogaster* в качестве



референсных нейтрально-эволюционирующих последовательностей для сравнения с другими локусами и детекции отбора (Parsch et al., 2010).

Изменения длины интронов с течением времени также представляют значительный интерес. На основании анализа нуклеотидных последовательностей интронов рибосомных белков 27 видов разных многоклеточных животных была высказана гипотеза изменения длины интронов: изменения происходят от 5'-конца к 3'-концу, где встраиваются некоторые структурные блоки размером около 60 п.н., имеющие сходство с кодирующими последовательностями тех же генов, которые при этом могут быть разделены спейсерами любой длины (Zhang et al., 2016). При этом распределение длин и уровни совпадения наиболее совпадающих участков соответствуют чертам микроРНК и малых интерферирующих РНК.

Анализ эволюции интронов на популяционном уровне – один из ключевых способов для понимания эволюции интронов, однако, пока внутривидовая динамика остается практически не изученной. Одним из известных видов, у которых в настоящее время происходит активное появление новых интронов – планктонный рачок *Daphnia pulex* (Li et al., 2009).

Детальное исследование интронов в разных популяциях североамериканских дафний позволило выявить 90 неоинтронов в 66 генах. Новые интроны не отличались по длине от более древних, но имели более высокое АТ-содержание; а экзоны, фланкирующие новые интроны оказались значительно короче тех, которые окружают древние интроны (в среднем 55 и 210 п.н., соответственно); новые интроны также не имели «предпочтительных» сочетаний нуклеотидов и распределения длин (Li et al., 2014).

Ранее при оценке гомологичных позиций интронов на основании консервативности их последовательностей вероятность параллельного встраивания разных интронов в одну и ту же позицию оценивалась от 5 до 20% (Nguyen et al., 2005; Carmel et al., 2007). Однако, для популяций *D. pulex*

почти половина новых интронов (48%) составили параллельные вставки. По предположению авторов наличие прямых коротких повторов в новых интронах и смежных экзонах свидетельствует о репарации двухцепочечных разрывов ДНК (дцрДНК) с «липкими» и/или «тупыми» концами.

Кроме того, и сами последовательности неоинтронов содержат большое количество таких повторов, в отличие от древних интронов, что, вероятно, свидетельствует о том, что повторы формируются непосредственно во время встраивания интрона (механизм не ясен), а затем накапливают мутации.

По типу встраивания интроны делят на несколько типов в зависимости от наличия следов репарации «тупых» и «липких» двуцепочечных разрывов, а также вставок.

При этом источник большинства новообразованных интронов дафний (98%) остается неизвестным. Возможно, такие последовательности неоинтронов содержат непрерывный сегмент *de novo* синтезированной ДНК, поскольку большинство новых интронов не имели никаких гомологов в геноме дафний (Li et al., 2014).

При исследовании интронов четырех видов аскомицетов рода *Neurospora* было обнаружено, что потери и вставки интронов у одного из видов происходят с большей скоростью, чем нуклеотидные замены, а потери преобладают над вставками, кроме того, приобретенные интроны не были подвержены действию отбора (Sun et al., 2015).

### **Интроны в качестве филогенетических маркеров**

Для исследования высоких таксономических рангов нет необходимости в использовании интронных последовательностей, поскольку возможно использование белок-кодирующих участков или их фрагментов (отдельных наиболее консервативных позиций кодонов). Кроме того, интронные маркеры чаще всего не подходят для филогении на высоких таксономических уровнях, так как накапливают слишком много инсерционно-делеционных

мутаций, сильно затрудняющих выравнивание, и подчас делаю его невозможным на уровне семейств (Teske, Beheragaray, 2009) и даже родов у позвоночных (Prychitko, Moore, 1997; Sequeira et al., 2006), кроме того возможны вставки неродственных интронов в одни и те же сайты (Li et al., 2014).

При исследовании филогенетических отношений близкородственных видов, напротив, одной из основных возникающих трудностей является нехватка достаточно переменных маркеров несцепленных между собой. Поэтому интроны ядерных генов представляются идеальными маркерами для исследования групп «молодых» видов.

В результате крупного мультилокусного анализа было показано, что отношения скоростей накопления нуклеотидных замен в митохондриальном и ядерном геномах сильно отличаются: у беспозвоночных (насекомых и арахнид) приблизительно в 2-6 раз, а у позвоночных приблизительно в 20 раз (Allio et al., 2017). Гомогенность этого отношения внутри таксонов и внутривидовая изменчивость могут быть связаны с отрицательной корреляцией между скоростью фиксации замен в мтДНК и эффективным размером популяции, независимо от действия отбора. Из-за чего было высказано предположение, что баркодинг по фрагментам мтДНК будет хуже применим по отношению к беспозвоночным.

Впервые в качестве филогенетического маркера интронные последовательности были использованы для популяционного анализа: для быстрого анализа аллелей без секвенирования использовался денатурирующий полиакриламидный электрофорез (Lessa, 1992). Этот метод получил название Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC) (Palumbi, Baker, 1994), поскольку для амплификации интронов использовались укорененные в экзонах ПЦР-праймеры.

Поскольку интронные последовательности могут содержать гиперпеременные микро- и минисателлитные повторы, их использование в качестве филогенетических маркеров, не требующих секвенирования, часто

возможно на внутривидовом уровне (Li et al., 2004). В качестве дополнительных стратегий для различения аллелей интронов использовали также рестрикционный анализ (Slade et al., 1993).

С ростом доступности ДНК-секвенирования возросло и количество работ, где сравниваются непосредственно нуклеотидные последовательности интронов.

Развитию EPC-методологии способствовало в первую очередь то, что множество интронов имеют достаточно консервативные позиции у представителей крупных таксонов (Rogozin et al., 2003), а белок-кодирующие последовательности достаточно консервативны для создания универсальных праймеров.

К другим важным преимуществам интронных маркеров можно отнести: высокую вариабельность, по сравнению с белок-кодирующими фрагментами, меньшую подверженность гомоплазии и накоплению компенсаторных замен по сравнению с микросателлитными маркерами. По сравнению с одним из наиболее распространенных ядерных маркеров — внутренним транскрибируемым спейсером (ITS, internal transcribed spacer), который может быть повторен в геноме несколько сотен раз (Mindell, Honeycutt, 1990), возможно подобрать интроны однокопийных генов, что снижает вероятность амплификации псевдогенов и паралогов.

Предполагается, что интроны редко подвержены действию отбора и эволюционируют преимущественно нейтрально, однако все же могут быть подвержены сцепленному наследованию (генетический «хичхайкинг»), поскольку являются фрагментами работающих генов, на экзоны которых действует отбор. Однако, межгенные спейсеры, по всей вероятности, также редко бывают селективно нейтральными. Консервативные вторичные структуры на уровне от родов до порядков, которые могут участвовать в процессинге рРНК, были отмечены в строении ITS-1 и ITS-2 эукариот (Coleman, 2007; Schultz et al., 2005; Coleman, 2015), также известно явление согласованной эволюции под действием движущего отбора —

«гомогенизации» внутригеномных копий посредством рекомбинации (Ambrose, Crease, 2011). Однако генная конверсия также была отмечена и для интронных последовательностей беспозвоночных. У морских звезд порядка Forcipulatida (Echinodermata: Asteroidea) в пятом и седьмом интронах гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы были обнаружены высоко консервативные повторы длиной 140 п.н., формирующие устойчивые шпильчатые структуры (Foltz., 2007). Как отмечает автор, в структуре повтора можно отметить некоторое сходство со структурой тРНК-подобных коротких диспергированных повторов (tRNA-derived SINE), хотя отсутствует промотор.

Как и в случае с другими аутосомными маркерами, использование интронов может осложняться, например, гетерозиготностью, рекомбинантными аллелями или наличием расположенных в повторах, неоднозначно выравниваемых инделов. Кроме того, аутосомные маркеры имеют вчетверо больший эффективный размер популяции по сравнению с митохондриальным геномом, что увеличивает время коалесценции этих маркеров в четыре раза (Рис. 4).

Если аллели интрона у одной особи отличаются по длине, для физического разделения аллелей лучше использовать клонирование или электрофорез в полиакриламидном геле, если же аллели отличаются только нуклеотидными заменами, возможно использование специализированного программного обеспечения для реконструкции наиболее вероятных аллельных вариантов (Stephens et al., 2001). Наиболее широкое распространение применительно к коротким нуклеотидным фрагментам получила программа PHASE, которая сочетает байесовский подход и теорию коалесценции для предсказания и оценки вероятностей спектров гаплотипов в природных популяциях (Garrick et al., 2010). Поскольку программа PHASE использует метод Монте-Карло по схеме Марковских цепей, чтобы получить апостериорные распределения потенциальных пар гаплотипов, которые могут быть рассчитаны для каждого неоднозначного генотипа,

рассчитываются доверительные интервалы вероятностей для каждого сегрегирующего сайта и каждой пары гаплотипов (Stephens et al., 2001; 2003).

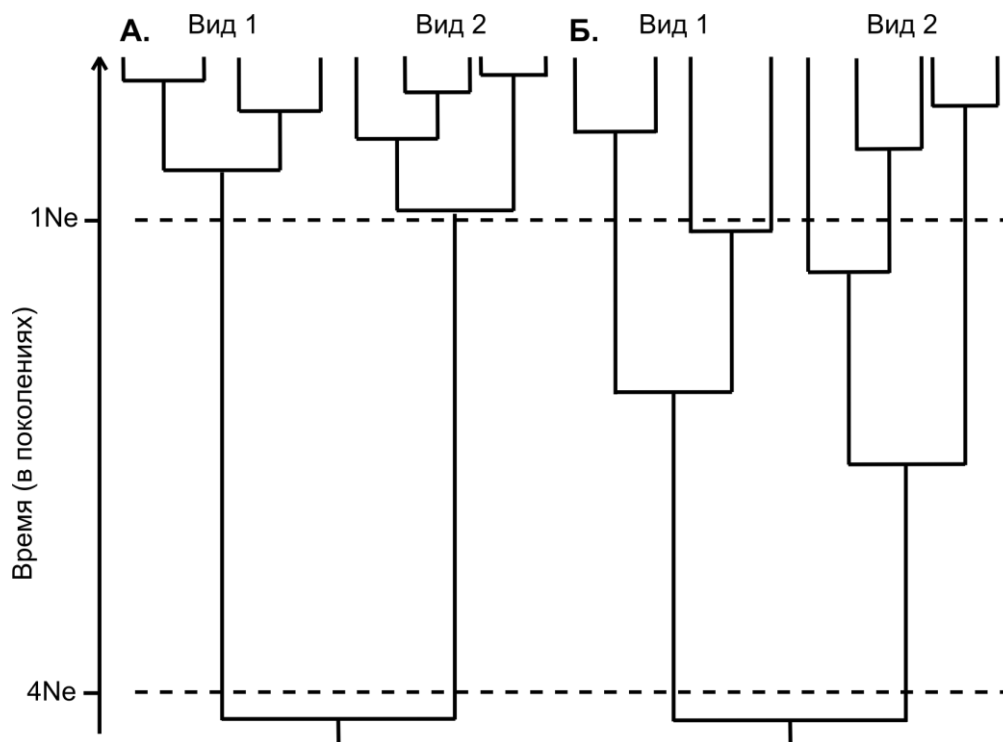


Рис. 4. Схематичный пример коалесценции митохондриального (А) и аутосомного локуса (Б).

Однако, точность реконструкции очень чувствительна к высокому уровню гетерозиготности, большому числу редких аллелей и наличию гибридных зон между популяциями. Показано, что при соотношении количества аллелей к количеству организмов 1:2 можно добиться 100%-ой точности при реконструкции аллелей, например, последовательностей главного комплекса гистосовместимости у птиц (Alcaide et al., 2011).

Высокий полиморфизм с большим числом сегрегирующих сайтов в больших и достаточно хорошо изолированных популяциях, в случае гибридизации в зонах вторичного контакта, вероятно, может приводить к появлению генотипов с сильно различающимися аллелями или новых рекомбинантных аллелей. При изучении природных популяций кузнечиков в Европе было показано, что относительно короткий ядерный фрагмент был вовлечен в рекомбинацию или генную конверсию со скоростью более чем в два раза превышающей скорость фиксации нуклеотидных замен (Ibrahim et

al., 2002). Поэтому в ряде случаев рекомендуется сочетать экспериментальные и вычислительные методы для установления последовательностей аллелей.

Некоторое время сдерживающим фактором на пути развития ERIS-маркеров были трудности связанные с подбором универсальных праймеров. Одними из первых был разработан ряд праймеров консервативных для целомических животных, остальные в основном были разработаны для достаточно узких таксономических групп (Jarman et al., 2002). Наибольшее распространение в применении к беспозвоночным получили несколько интронов: интроны генов  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединиц АТФ-синтазы, а также транспортер аденина (ANT- adenine nucleotide translocator), что позволяет сравнить результаты, полученные для разных групп организмов, по одному и тому же интронному маркеру.

Особенно большое распространение эти маркеры приобрели в филогенетических исследованиях кораллов и губок, что связано с медленными темпами накопления нуклеотидных замен митохондриальными геномами радиальных животных, за исключением некоторых порядков (Lavrov, Pett, 2016).

При исследовании комплекса видов кораллов рода *Montipora*, расхождение которых датируется приблизительно 1 млн. лет назад, было показано, что интрон гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы сохраняет предковый полиморфизм, в то время как спейсерные последовательности (ITS-1 и ITS-2) позволили выявить столько же клад, сколько и контрольный регион митохондриального генома (Forsman et al., 2010). Похожие результаты, когда межгенные спейсеры имели более «высокое филогенетическое разрешение», чем интроны, были получены и для других мадрепоровых кораллов рода *Pocillopora* (Flot et al., 2010).

Однако при исследовании генетической структуры двух видов губок: широкоареальных индотихоокеанских *Leucetta chagosensis* и обитателей большого барьерного рифа *Pericharax heteroraphis*, полиморфизм того же

интрона в четыре и в семь раз, соответственно, превысил полиморфизм обоих внутренних транскрибируемых спейсеров. Состав филогенетических клад по обоим маркерам, за редким исключением, был одинаков в случае давно разделившихся популяций губок с большим ареалом (Wörheide et al., 2008), а для губок с меньшим ареалом «разрешающая» способность интрона по сравнению со спейсерами оказалась значительно выше (Bentlage, Wörheide, 2007). Исследование популяционной структуры новозеландских морских блюдечек *Cellana strigilis* показало сходство результатов, полученных с помощью интронных и митохондриальных маркеров (Reisser et al., 2011).

Кроме того, интрон  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы использовался для популяционных исследований морских полихет различных порядков: *Riftia pachyptila*, *Polydora hoplura* (Coykendall et al., 2011, David et al., 2016). Можно заключить, что информативность каждого отдельного интронного маркера может широко варьировать как у разных таксонов, так и внутри одного таксона, поэтому необходимо проведение предварительных исследований вариабельности и информативности интронов на различных таксономических уровнях для разных групп животных.

### **Макрозообентос Байкала**

Макробеспозвоночные широко используются как биоиндикаторы водных экосистем. Это обусловлено рядом факторов: во-первых, макробеспозвоночные занимают промежуточное положение в пищевых цепях, связывая нижние и верхние трофические уровни, таким образом, их разнообразие может в целом характеризовать состояние и продуктивность водных систем (Murphy et al., 2015). Во-вторых, макробеспозвоночные встречаются повсеместно и отличаются по степени восприимчивости к разным изменениям (Steinman et al., 2003; Von Bertrab et al., 2013). Наконец, бентосные беспозвоночные относительно малоподвижны и непосредственно контактируют с дном и водной толщей, и могут реагировать на изменения



состояний каждой из сред (Feio et al., 2007; Von Bertrab et al., 2013). Кроме того, сообщества макробеспозвоночных чутко реагируют на эвтрофикацию, изменения концентрации кислорода, и структуры среды (Karr, 1998; Lücke, Johnson, 2009; Saloom, Duncan, 2005; Steinman et al., 2003).

Значительная географическая протяженность и многообразие экологических условий в Байкале привели к формированию уникального биологического разнообразия. В списке фауны озера по количеству видов преобладают микро- и макробеспозвоночные, значительная часть таксонов формирует букеты видов (Тимошкин, 2001). При этом большинство макробеспозвоночных — обитатели дна.

Известно, что среди факторов среды, влияющих на распределение зообентоса, большое значение имеют, кроме доступности пищи, свойства грунта, уклон дна, а также температурный режим придонных слоев. В результате взаимодействия этих и других факторов М. М. Кожовым отмечены количественные и качественные изменения состава зообентоса на глубине около 15-20 м., что соответствует переходу литоральной зоны озера в сублиторальную (Кожов, 1962). Разнообразие условий и биотопов способствовало формированию чрезвычайного видового богатства в литоральной зоне, и обусловило ее значение в экосистеме озера.

Сублитораль продолжается до глубин приблизительно 70 м и преобладающими группами макрозообентоса там являются олигохеты, гаммариды, моллюски, замещающиеся олигохетами при увеличении заиленности грунтов, плоские черви, полихеты, личинки хирономид и ручейников.

В литорали на каменистых грунтах сосредоточена основная масса растительности. Эти биотопы одни из самых густозаселенных, где численно преобладают моллюски, амфиподы и ручейники.

Мелкозернистые пески литоральной зоны заселены несколько меньше (8-20 м) – численно на них поровну представлены олигохеты, амфиподы, и моллюски (по биомассе преобладают последние), на меньших глубинах в

зоне волнового воздействия численно преобладают олигохеты и амфиподы, по биомассе – моллюски.

На основании данных о распределении видов моллюсков подсем. Baicaliinae М.М. Кожов также предложил выделять в озере Байкал две зоогеографические провинции или округа: северобайкальскую и южнобайкальскую с границей вдоль восточного берега вблизи устья р. Турка, вдоль западного— в районе пролива Ольхонские ворота (Кожов 1936, 1962). Сходные регионы отмечал Дорогостайский (1923), основываясь на встречаемости разных видов амфипод, но с более южными границами: вблизи устья р. Анга и северной окраины Селенгинского мелководья. Базикалова также отмечала переходный характер фауны гаммарид не только прибрежной, но и глубоководной зон в Центральной котловине озера (Базикалова, 1945).

Наряду с видами, чье обитание ограничено одной-двумя котловинами или провинцией, и не имеющих аналогов в остальном Байкале, существуют пары сестринских видов, имеющих незначительные морфологические отличия и занимающих одну нишу в разных частях ареала. Среди моллюсков подсем. Baicaliinae наиболее показательны псаммофильные *Pseudobaikalia pulla pulla* и *P. pulla tenuicosta*, а также литофильные *Maackia herderiana* и *M. variesculpta*. При этом отмечено перекрывание ареалов «северных» и «южных» видов гастропод к югу от Малых Ольхонских ворот (до бухты Анга), вдоль восточного побережья Ольхона и от мыса Сухинский до южной оконечности п-ова Святой Нос (Sitnikova, 2006).

Ранее считалось, что амфиподы *Acanthogammarus maculosus* из Северной и Средней котловины и *A. victorii* из Южной котловины также являются парой сестринских раздельно ареальных видов, однако филогенетический анализ показал базальное положение *A. victorii* по отношению к трем северным сестринским видам с перекрывающимися ареалами (Daneliya et al., 2011). Для хирономид *Sergentia baicalensis* на основании митохондриального маркера было показано существование двух популяций: северной и южной, а

также их смешивание вдоль западного берега центральной котловины (Кравцова и др., 2015).

М.М. Кожов отмечает, что наблюдаемые фаунистические отличия лишь отчасти можно объяснить некоторыми физико-географическими особенностями (сроки вскрытия ото льда, температура приповерхностных вод), при этом фауна Малого моря, по его мнению, имеет выраженный «северный» характер, несмотря на значительные отличия в режиме вод в этом районе (Кожов, 1962).

Необходимо отметить, что, несмотря на большие линейные размеры, в озере практически нет условий для долговременной пространственной изоляции даже относительно малоподвижных организмов. Только для хирономид датировки возникновения пространственно-генетической дифференциации совпадают с периодом существования нескольких разобщенных водоемов на территории современного озера (более 6 млн. лет назад) (Кравцова и др., 2015). Ряд авторов связывает формирование популяций у некоторых бентосных беспозвоночных в Байкале с сохранением фауны в рефугиумах во время оледенений плейстоцена (Daneliya et al., 2011; Гоманенко и др., 2005; Камалтынов, 2001). Среди возможных рефугиумов по наличию тепловодных реликтов Р.М. Камалтынов указывает заливы Култук, Баргузинский и Чивыркуйский, юг Малого моря, бухты Ая, Анга и Песчаная, Селенгинский район, Муринская банка (Камалтынов, 2001).

Поскольку Байкал с палеогена до настоящего времени изменялся от мелко- и тепловодного озера (Попова и др., 1989), вероятно, эвтрофного и с повышенной минерализацией, к ультраглубокому и ультрапресному, соответствующие изменения претерпевала и фауна озера: общие предки различных таксонов беспозвоночных в разное время вселились в озеро. Большинство бентосных беспозвоночных, за исключением моллюсков, не имеют палеонтологических остатков, что не позволяет оценить процессы формирования фауны другими методами, кроме молекулярной генетики.

Эволюционно амфиподы, видимо, одни из самых древних обитателей водоема, сохранившиеся до наших дней. В Байкале на данный момент известно 10 семейств бокоплавов чрезвычайно разнообразных по морфологическим и экологическим характеристикам (Тахтеев, 2000; Камалтынов, 2001).

Достаточно уверенно можно заявлять, что, было, по меньшей мере, две колонизации, давшие начало «букетам видов». При этом возраст первой группы, «теплолюбивых реликтов» сем. *Micropodidae* и *Cryptopodidae*, может превышать современные оценки возраста озера (Камалтынов, 2001). На данный момент амфиподы представляют существенную часть донных сообществ (в большинстве случаев более 20%), а единственный пелагический вид является одним из основных компонентов пелагиали (Базикалова, 1945).

Исследование частичных транскриптомов 64 видов байкальских амфипод позволило предполагать стремительную морфологическую эволюцию амфипод второй волны вселения: представителей сем. *Acanthogammaridae*, *Eulimnogammaridae*, *Pallaseidae* и других; а также действие положительного отбора на белки митохондриальных мембран и кальций-связывающие белки, экспрессирующиеся в мышечных тканях (Naumenko et al., 2017).

Изучение последовательностей полных митохондриальных геномов некоторых байкальских амфипод позволило установить их значительную изменчивость: многочисленные изменения порядка генов, переход генов с одной цепи на другую, а также ремолдинг генов тРНК (Romanova et al., 2016).

На данный момент в озере описано 348 видов амфипод, и этот список продолжает пополняться (Камалтынов, 2001; Bedulina et al., 2014).

Эволюционно более молодые представители байкальского бентоса – пресноводные полихеты рода *Manayunkia*. В Байкале на данный момент описаны только три вида, отличающиеся, в первую очередь, по субстратным предпочтениям и, соответственно, субстрату, используемому для

строительства трубочек (Ситникова и др., 1997). Эти малоподвижные во взрослом состоянии сестонофаги-фильтраторы имеют наружное оплодотворение, а личинки развиваются в материнских трубках. Можно ожидать высокой степени генетической дифференциации между небольшими изолированными популяциями, или колониями полихет, которая будет увеличиваться прямо пропорционально увеличению расстояний между ними. При этом гены, наследуемые по материнской линии, по всей вероятности, будут более четко сегрегированы, а аутосомы будут перемешиваться между популяциями благодаря переносу мужских половых клеток.

Возраст группы байкальских полихет, оцененный по последовательностям фрагмента гена цитохром с-оксидазы, составляет менее 5 млн. лет, а время расхождения от общего предка с пресноводными манаюнкиями Колымы — 7 млн. лет (Пудовкина и др., 2015). Генетические дистанции представителей вида *M. zenkewitschii* сопоставимые с межвидовыми дистанциями, позволили предполагать наличие криптических видов, обитающих совместно.

Одной из наиболее молодых и при этом морфологически многообразных групп является эндемичное подсемейство байкальских моллюсков Baicaliinae, содержащее приблизительно четверть всего видового разнообразия малакофауны озера: более 40 из 180 видов (Ситникова, 2004).

Значение эндемичных байкальских гастропод для экосистемы озера сложно переоценить: они преобладают по биомассе в большинстве донных биотопов, а их численность может достигать 98% численности макрозообентоса (Кожов, 1962; Kravtsova et al., 2004). Представители подсемейства населяют множество ниш от уреза воды до сублиторальной зоны, являясь фильтраторами по типу питания, и служат важным компонентом кормовой базы для некоторых видов рыб (Кожов, 1936; 1962; Ситникова, 2004). Свойства, позволившие байкалиинам так успешно адаптироваться к огромному количеству разных экотопов, представляют отдельный интерес для эволюционной биологии. Потому как

филогенетические исследования показали, что возраст последнего общего предка не превышает 3 млн. лет, хотя отделение их от общего с *Amnicolidae* и *Bithyniidae* предка произошло порядка 160 млн. лет назад (Зубаков и др., 1997; Hausdorf et al., 2003). Хотя оценки возраста этой группы оказываются очень приблизительными из-за отсутствия достоверной информации о мутационных скоростях разных линий моллюсков и невозможности подобрать достаточно близкую внешнюю группу для филогенетического анализа. Наличие палеонтологических данных не слишком способствует установлению точных датировок дивергенции семейства: возраст танхойской свиты, где было обнаружено большинство раковин, сходных с современными байкалиинами, датируется миоценом – ранним плиоценом (ок. 23-3.6 млн лет) (Рассказов и др., 2014). Детальное исследование генетического полиморфизма нескольких видов рода *Baicalia* показало, что видообразование в этой группе происходило стремительно, а размах внутривидового полиморфизма может быть сопоставим с генетическими расстояниями между представителями хорошо морфологически и экологически различающихся видов (Перетолчина и др., 2007).

Изучение демографических историй четырех видов байкальских гастропод и одного вида амфипод позволило сделать вывод, что потепление климата 25-30 тыс. лет назад по-разному отразилось на видах с разной субстратной специфичностью: виды-генералисты, вероятно, увеличили свою численность, в то время как популяции видов, занимающих более узкие ниши, сохраняли стабильную численность (Fazalova et.al., 2010).

Исследование разных таксономических групп беспозвоночных с использованием переменных ядерных маркеров поможет не только прояснить эволюционную историю и особенности симпатрического видообразования, но и будет способствовать ревизии байкальских эндемиков.

## Особенности биологии *Korotnewia semenkewitschi* и *Gmelinoides fasciatus*

Поскольку у разных байкальских организмов можно наблюдать схожие пространственные паттерны в распределении морфологических форм или подвидов в озере, интересно рассмотреть внутривидовую изменчивость по различным генетическим маркерам у представителей бентоса, отличающихся подвижностью и способностью к расселению. Малоподвижные моллюски *Korotnewia semenkewitschi* и амфиподы *Gmelinoides fasciatus* обитают на сходных глубинах, представители этих видов из разных зоогеографических провинций имеют морфологические отличия (Камалтынов, 2001; Ситникова, 2004).

В Байкале описаны два подвида моллюсков *Korotnewia semenkewitschi*: *semenkewitschi* (Lindholm, 1909) и *nitida* (Кожов, 1936), отличающиеся микроскульптурой раковины и формой оборотов. Первый обитает в Северном и Среднем Байкале: от Малого моря до Селенгинского мелководья; второй – в Южной котловине озера: находки описаны от бухты Песчаной до акватории вблизи п. Мурино. При этом ранее было отмечено, что популяции, обитающие в Баргузинском и Чивыркуйском заливах, отличаются от прочих представителей вида меньшими линейными размерами (Ситникова, 2004). Таким образом, этот вид формирует почти непрерывный ареал вдоль побережья озера, населяя песчаные и илистые грунты мелководной платформы Байкала, которые прерываются выходами скальных пород вдоль западного побережья озера. Данная пара подвидов имеет географическую структуру, схожую с таковыми у других пар подвидов и видов этого же семейства.

*Gmelinoides fasciatus* — бентосная фитофильная амфипода-генералист, легко заселяющая новые местообитания с различными типами субстратов, вытесняя при этом автохтонные виды. Эти рачки редко покидают верхний пояс растительности в литоральной зоне, предпочитая глубины от 0 до 10 м,

что способствует формированию своеобразного «ленточного ареала» в озере Байкал (Базикалова, 1945; Гоманенко и др., 2005).

Минимальная скорость расселения *G. fasciatus* была оценена 2.5 км/мес., благодаря изучению сезонных заселений в реки Верхняя Ангара и Кичера из Байкала (Камалтынов, 2001).

Известно, что виды-генералисты, а также виды, обладающие высокой способностью к расселению, редко формируют четкие филогеографические структуры (Koblmuller et al., 2012; Diedericks, Daniels, 2014). Однако анализ последовательностей митохондриального гена CO1 показал существование четырех генетических кластеров с практически неперекрывающимися ареалами вдоль берега озера, между которыми наблюдается лишь незначительный поток генов (Гоманенко и др., 2005). Ареалы выявленных кластеров были названы в соответствии с географическим распространением вдоль берегов озера Байкал: юго-западная, юго-восточная, северная и центральная популяции. Формирование такой внутривидовой структуры авторы связывают с сохранением предков современных популяций в нескольких рефугиумах во время оледенений плейстоцена (Гоманенко и др., 2005).

При этом наибольшая генетическая дистанция между юго-западной и северной популяциями и отсутствие между ними мигрантов сделали возможным предполагать, что *G. fasciatus* представляет собой несовершенный кольцевой вид. Популяция, обитающая вдоль западного побережья южной котловины озера, обладает низкой внутривидовой изменчивостью, но генетически значительно отличается от всех остальных. На основании этого было сделано предположение о прохождении популяции через «бутылочное горлышко» (Гоманенко и др., 2005; Fazalova et al., 2010). Снижение генетического разнообразия также может быть связано с действием отбора на митохондриальный геном, например, в результате формирования цитоплазматической несовместимости при заражении внутриклеточными паразитами. Последнее предположение нашло косвенное



подтверждение в обнаружении дифференциальной зараженности микроспоридиями разных популяций исследуемого вида и случаев коинфекции отдельных особей юго-западной популяции (Петунина, 2015).

Поскольку митохондриальный геном является единой группой сцепления, возникновение в нем адаптивных мутаций может приводить к стремительному «селективному подметанию». К тому же вчетверо меньший, чем для ядерных маркеров, размер эффективной численности делает его более подверженным дрейфу. Также искажению филогенетической информации могут способствовать интрогрессии и гомоплазия.

Учесть влияние этих процессов на результаты филогенетического анализа можно с помощью привлечения ядерных маркеров. В целом совместный анализ разнородной информации, касающихся одних и тех же видов, позволяет наиболее полно описать процессы их образования. В частности, несовпадение филогений, полученных с использованием генетических маркеров различной локализации, может пролить свет на важные подробности механизмов микроэволюционных процессов и обнаружить, например, различные типы интрогрессии. Интрогрессии, в свою очередь, могут указывать на вторичные нарушения репродуктивных барьеров и следы межвидовой гибридизации (Pacheco et al., 2002). Одной из наиболее привлекательных возможностей расширения фактической основы эволюционного анализа является использование быстро эволюционирующих некодирующих ДНК-маркеров. Информативность сплайсосомных интронов в качестве филогенетических маркеров зависит от многих факторов: изменчивости длин интронов, вариабельности нуклеотидных последовательностей интронов, возможности параллельного встраивания интронов, а также наличия или отсутствия мишеней для действия естественного отбора. Исследование возможностей применения разных интронов на различных таксономических уровнях для разных групп животных необходимо именно ввиду таксон-специфичных особенностей эволюции отдельно взятого интрона. В рамках настоящей работы была

сделана попытка проследить особенности эволюции неконсервативных интронов у трех групп беспозвоночных с совершенно различными эволюционными историями с тем, чтобы выяснить подробности микроэволюционных процессов у этих организмов.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Морфометрические измерения раковин моллюсков

Раковины заспиртованных моллюсков помещали на темный фон для того, чтобы сделать серию из 3-5 снимков с разной дистанцией фокусировки объектива. Объединение фотографий проводилось с помощью программы Helicon Focus v. 6.5. Полученная фотография использовалась для измерения тринадцати морфометрических признаков в соответствии с иллюстрацией из статьи (Sitnikova, Maximova, 2016) (Рис. 5).

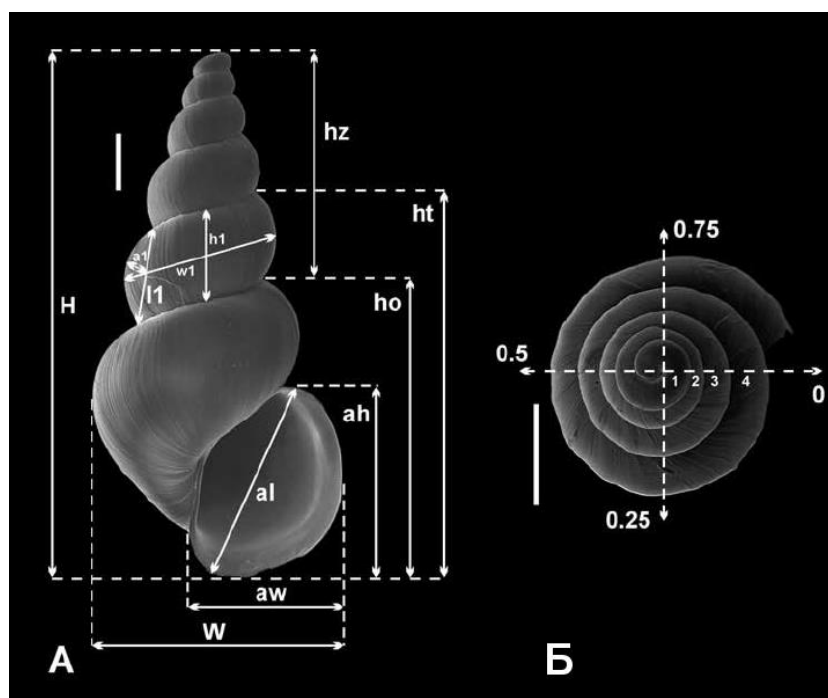


Рис. 5. Схема измерений раковины моллюска (Sitnikova, Maximova, 2016). А.  $H$  = высота раковины;  $W$  = ширина раковины;  $aw$  = ширина устья;  $al$  = длина устья;  $ah$  = высота устья;  $hz$  = высота завитка;  $ho$  = высота последнего оборота;  $ht$  = высота двух последних оборотов;  $h1$  = высота предпоследнего оборота;  $w1$  = ширина предпоследнего оборота;  $l1$  = боковая диагональ предпоследнего оборота;  $al$  = крутизна предпоследнего оборота; Б. Вид сверху, подсчет количества оборотов. Масштаб: 1 мм.

### Экстракция ДНК

Сбор бентосных беспозвоночных производился с помощью драги и водолазных скребков с глубин от 2 до 50 м.

Животных фиксировали 70%-м этиловым спиртом и хранили до экстракции ДНК.

Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление с помощью центрифугирования фрагментов органелл и мембран, ферментативное разрушение белков и их экстрагирования из раствора с помощью фенола и хлороформа, концентрирование молекул ДНК путем преципитации в этаноле. ДНК экстрагировали по модифицированному методу Дойла (Doyle, 1987):

1. Фиксированный спиртом образец отмывали дистиллированной водой три раза по 30 минут.
2. Кусочек ткани заливали 100-500 мкл (в зависимости от размера образца) лизирующего раствора (100mM Трис-HCl; 1,4M NaCl; 0,5M ЭДТА; 2% СТАВ) и гомогенизировали.
3. Прогревали в термостате при температуре 60°C два часа, периодически встряхивая.
4. Затем добавляли 100-500 мкл хлороформа и 30 минут встряхивали на шейкере.
5. Центрифугировали 10 минут. Отбирали верхнюю фазу, добавляли к ней равный объем изопропанола и оставляли при -20°C на несколько часов.
6. Центрифугировали 5-10 минут, отбирали надосадочную жидкость.
7. Промывали осадок ДНК четыре раза 70% этанолом и подсушивали 20-30 минут при температуре 37°C.
8. После того, как ДНК высохнет, добавляли 50-100 мкл дистиллированной воды (в зависимости от количества ДНК) и растворяли в термостате при температуре 37°C.

### **Амплификация ДНК**

Протестированы 2 набора EPIC-праймеров для ручейников (Tau et al., 2008) и амфипод (Bierne et al., 2000), использованные ранее для изучения

меж- и внутривидового полиморфизма близкородственных видов хлопковой совки (*Helicoverpa sp.*) и тихоокеанских креветок (*Penaeid sp.*) по последовательностям интронов рибосомальных (RpS2, RpS4, RpS8, RpS10, RpS15A, RpL12, RpL30) и ряда других белков (амилаза, актин, ГТФ-связывающий белок, катепсин L, тяжелая и легкая цепи миозина, опсин, трипсин 3, тропомиозин I и II, фактор элонгации 2, химотрипсин B), и рекомендованные авторами для родственных организмов. Однако продуктов амплификации получить не удалось, и далее были использованы праймеры универсальные для целомических организмов.

Амплификацию фрагментов генов  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединиц АТФ-синтазы проводили с использованием универсальных праймеров, фланкирующих единственные интроны этих генов (Jarman et al., 2002), а также специфичных для моллюсков праймеров на фрагмент гена белка подобного БТШ-70 (HSC70) (Lee, Boulding, 2009). Праймеры имеют следующую структуру:

ATPS $\alpha$  F: 5' – GAGCCMATGCAGACTGGTATTAAGGCYGT– 3'

ATPS $\alpha$  R: 5' – TTGAANCKCTTCTGGTTGATGATGGTGTC– 3'

ATPS $\beta$  F: 5' – CGTGAGGGHAAYGATTTHTACCATGAGATGAT– 3'

ATPS $\beta$  R: 5' – CGGGCACGGGCRCCDGGNGGTTTCGTTTCAT– 3'

HSC70 F: 5' – GGCACSTTTGACGTGTCAGTCC– 3'

HSC70 R: 5' – TCCACAGGCTCCAGTGTGCCAC– 3'

где R- G/A; K- G/T; Y- C/T; M- C/A; D- A/G/T; H- A/C/T; N-любой нуклеотид (по номенклатуре IUPAC).

Параметры при 35 циклах амплификации были следующими: предденатурация ДНК при 94°C- 2 мин, денатурация ДНК при 94°C – 20 с, отжиг праймеров 1 мин, элонгация нуклеотидной цепи при 72°C – 1 мин (+5 минут на последнем цикле).

При тестировании праймеров использовали минимальную температуру отжига 46°C, впоследствии повышая ее на 2°C, до исчезновения продукта, и используя затем в качестве температуры отжига предпоследнее значение. Температуры отжига, выбранные для получения специфичных продуктов

разных праймеров у разных таксонов, приведены в таблице 1. Отжиг при амплификации фрагмента гена HSC70 у моллюсков составил 58°C.

Амплификация митохондриальных маркеров также осуществлялась с помощью универсальных праймеров на фрагмент гена цитохром с-оксидазы и 16S рДНК (Folmer et al., 1994; Palumbi et al., 1996).

Таблица 1. Температура отжига, используемая при амплификации разных фрагментов ДНК у разных групп организмов.

Группа организмов	АTPSa	АTPSb
Амфиподы надсем. Gammaroidea (кроме <i>Gmelinoides fasciatus</i> )	–	ТА=48°C
<i>G. fasciatus</i>	–	ТА=52°C
Моллюски подсем. Baicaliinae	ТА=54°C	ТА=56°C
Полихеты рода <i>Manayunkia</i>	ТА=55°C	–

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов CO1, 16S мтДНК и интронов частично депонированы в GenBank с номерами доступа: KF201695- KF201709, KT808636- KT808649, KT885092- KT885148.

### **Очистка амплифицированных фрагментов в геле легкоплавкой агарозы**

К реакционной смеси после амплификации добавляли 5 мкл буфера для нанесения (70% глицерин; 5мМ натриевой соли ЭДТА рН 8,0; 0,02 % бромфенолового синего) и наносили на 0.8-1%--ый гель легкоплавкой агарозы в трис-ацетатном буфере с 1 мкг/мл бромистого этидия. Фрагменты соответствующего молекулярного веса вырезали из геля при мягком ультрафиолетовом освещении, помещали в пластиковые пробирки, выдерживали несколько часов при -20°C. Центрифугировали 10 минут в центрифуге «Эппендорф» (12000 об/мин). Отбирали надосадочную жидкость, добавляли 1 мкл праймера и подсушивали при 45°C.

Прямое секвенирование двухцепочечных продуктов амплификации проводилось на автоматическом четырех капиллярном секвенаторе модели ABI3100 производства фирмы Applied Biosystems, с реактивом BigDye версии 3.1. при помощи тех же праймеров (ATPSa F, ATPSa R, ATPSb F, ATPSb R, HSC70 F, HSC70 R) в Центре Секвенирования ДНК в г. Новосибирске и в ЗАО «Синтол» в г. Москве.

### **Анализ нуклеотидных последовательностей**

Выравнивание и редактирование нуклеотидных последовательностей проводилось с помощью программ Geneious v. 9.0.5 (Kearse et al., 2012) и MAFFT (Kato et al., 2013).

Верификацию 5' - донорных и 3' - акцепторных сайтов проводили с помощью поиска гомологии аминокислотных последовательностей из других групп организмов, взятых из базы данных на сервере Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с помощью инструментов BLASTn и BLASTp.

Для установления возможных рекомбинационных событий использовали методы, представленные в программе RDP v. 4, а также Phi-тест (Martin<sup>b</sup> et al., 2015; Bruen, 2005).

Генетические дистанции рассчитывались с использованием пакета «аре» (Analyses of Phylogenetics and Evolution) (Paradis et al., 2011).

Поиск тандемных парных повторов проводился с помощью программы Repfind (Betley et al., 2002). Поиск границ и анализ псевдогенов тРНК проведен с помощью программы tRNAscan-SE Search (Lowe, Chan, 2016).

### **Реконструкция гаплотипов**

Реконструкция гаплотипов каждого внутривидового набора данных по ядерному маркеру проводилась дважды независимо в программе DNAsp v. 5 (Librado, Rozas, 2009) методом PHASE (Stephens, Donnelly, 2003). Полученные

результаты сравнивали и использовали для дальнейшего анализа при отсутствии различий и высоких оценках вероятностей для индивидуальных аллелей и переменных сайтов (более 95%).

### **Клонирование ампликонов в плазмидном векторе**

Клонирование ампликонов, содержащих интроны, проводилось в плазмидном векторе pTZ57R/T (Fermentas) в компетентной культуре клеток *E. coli* штамма DH5 $\alpha$ .

Лигирование ампликонов в концентрации более 100 нг/мкл и плазмидного вектора 50 мг/мкл было проведено с помощью T4 ДНК-лигазы и соответствующего буфера согласно протоколу InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific).

Получение компетентных клеток достигалось обработкой ледяным раствором 0.1 М CaCl<sub>2</sub>. Трансформация клеток проводилась с 30 нг сверхспиральной плазмидной ДНК в объеме 10 мкл.

Клетки выращивались на чашках Петри со средой LB с добавлением ампициллина и X-gal. Среда LB содержала 10г/л бакто-триптона, 5г/л дрожжевого экстракта, 10г/л NaCl в деионизированной воде (pH 7.0).

Колонии, имеющие вставки не способны расщеплять X-gal с образованием синего пигмента. ДНК, экстрагированная из белых колоний, была использована для ПЦР с универсальными M13/pUC-праймерами и последующего определения нуклеотидных последовательностей.

### **Простирающиеся филогенетические древа**

При большом размере выборки и крайне небольших генетических дистанциях возможно существование большого количества близкородственных аллелей, отличающихся на несколько мутационных шагов. В филогенетической сети подобные альтернативные эволюционные события могут быть изображены в виде колец (Рис. 6).



Такой способ визуализации также позволяет учитывать события, которые не очевидны при использовании филогенетических деревьев: геновые дубликации, горизонтальный перенос генов или рекомбинацию. Поскольку все из гаплотипов существуют одновременно, мы не можем предполагать последовательность мутационных изменений.

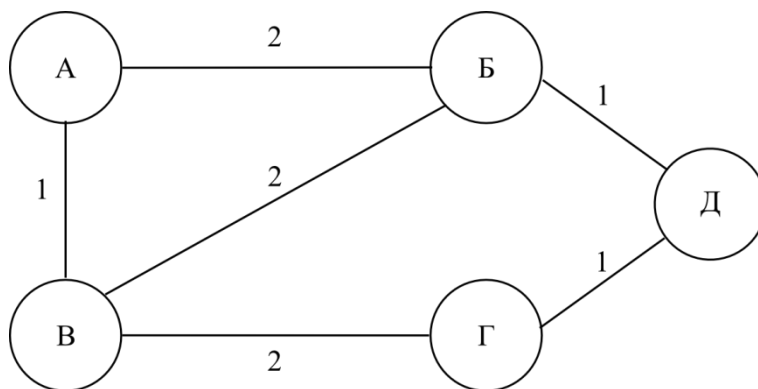


Рис. 6. Схема филогенетической сети. Буквами обозначены гаплотипы, цифрами — количество мутационных шагов между гаплотипами.

Для изучения популяционной структуры и филогенетических отношений таксонов, обладающих низкой вариабельностью, строили простирающиеся филогенетические деревья методом объединения медиан (Median Joining) с помощью программы Network v. 5.0.0.3 (Bandelt et al., 1999).

Метод объединения медиан представляет синтез алгоритма Краскала поиска наикратчайшего дерева и метода максимальной парсимонии, что позволяет ему добавлять новые «медианные вектора» — промежуточные аллели, существование которых можно предполагать, но которые не были обнаружены.

### Построение филогенетических деревьев

Филогенетические деревья были построены байесовским методом с помощью программы MrBayes 3.2.1 (Ronquist et al., 2012), а также методом максимального правдоподобия с помощью программы PhyML 3.1 (Guindon et al., 2010).

Для построения байесовских деревьев запускались 1 «холодная» и 3 «горячих» Марковских цепи длиной 6 млн. шагов, для построения финального дерева отбиралось каждое тысячное сгенерированное дерево, первые 25% деревьев не учитывались.

Наиболее правдоподобная модель нуклеотидных замен определялась в программе jModelTest (Posada, 2008).

В качестве моделей нуклеотидных замен для анализа каждого из наборов данных были выбраны наиболее близкие модели, доступные в программах PhyML и MrBayes. В программе PhyML для митохондриальных последовательностей полихет использовалась TN93 с гамма-коррекцией, для интронных последовательностей моллюсков — НКУ, для всех прочих (CO1 и интрон амфипод, CO1 моллюсков и интрон полихет) — НКУ с гамма-коррекцией.

При построении дерева видов моллюсков подсем. Baicaliinae частично использовались нуклеотидные последовательности CO1 из базы данных NCBI. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена CO1 байкалийн соответствующих видов с номерами AF445328.1, FN185835.1, FN185867.1, HM543405.1, HQ113296.1, Z92985.1, Z92992.1, Z92995.1, Z92998.1, Z92999.1, Z93000.1, Z93002.2, Z93003.2, Z93004.1, Z93005.2, Z93007.2, Z93013.2 были взяты из базы данных NCBI. Для видов *Korotnewia angigyra*, *K. korotnewi*, *K. semenkewitschi*, *Parabaikalia dubiosa*, *Pseudobaikalia contabulata*, *P. jenterriana*, *P. pulla*, *P. michelae* sp. n., *P. zachwatkini*, а также *Teratobaikalia ciliata* последовательности CO1 были определены в ходе данного исследования для тех же организмов, что и интронные последовательности.

Для байесовского анализа нуклеотидных данных была выбрана модель нуклеотидных замен GTR + gamma.

Морфологические признаки (таблица 5, 6, Приложение) превращали в наборы бинарных признаков с помощью программы Factor из пакета программ Phylip-3.69 (Felsenstein, 2004) с учетом гипотез о вероятных изменениях этих признаков (Кожов, 1936; Ситникова, 2004).

Весь набор данных был разбит на 5 групп: интронная последовательность, каждое положение кодона митохондриального гена CO1 отдельно, и морфологические признаки. Укоренение деревьев всегда производилось по средней точке.

### **Тесты на нейтральность мутаций**

В программе DNASP v. 5 (Librado, Rozas, 2009) для отдельных популяций *G. fasciatus* были проведены тесты на нейтральность эволюции: тест Таджимы (Tajima, 1989), тест Fs (Fu, 1997). В случае отклонения от нейтральности, чтобы различить возможные эволюционные сценарии проводили тесты R2 – для детекции популяционного роста (Ramos-Onsins, Rozas, 2002) и H – для подтверждения действия отбора (Fay, Wu, 2000). Статистическая значимость каждого теста оценивалась там же с помощью коалесцентных симуляций в количестве 20.000 реплик.

### **Статистическая обработка данных**

Значения анализа молекулярной вариации (AMOVA) и попарные значения  $F_{st}$ , а также статистическая значимость этих критериев, рассчитывались в программах SAMOVA 2.0 и ARLEQUIN v. 3.5.1.2 (Duranloup et al., 2002; Excoffier, Lischer, 2010).

Статистическая обработка данных проводилась в языке программирования R с помощью пакетов «ape», «pegas», «phytools», «vegan» (Okasen, 2010; Paradis et al., 2004, 2010; Revell, 2012). Нормальность распределения выборок оценивалась с помощью тестов Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Неравенство средних значений выборок тестировалось для нормально распределенных выборок с помощью критерия Стьюдента, для прочих— сравнение медианных значений по методу Уилкоксона. Отличия дисперсии для выборок также оценивались с помощью критерия Фишера и критерия Колмогорова-Смирнова. Для анализа

морфологических признаков использовались метод главных компонент и кластерный анализ.

### **Поиск высокоповторенных последовательностей в выборках ридов ценогастропод**

Поиск повторенных последовательностей проводился с помощью набора инструментов RepeatExplorer на сервере Galaxy (Novák et al., 2013). Из библиотек ридов полученных методом высокопроизводительного секвенирования с помощью системы Illumina HiSeq2000 с длиной прочтения 100PE (Illumina, San Diego, CA) были сделаны выборки размером 3 млн последовательностей длиной от 95 п.н. и качеством прочтения каждого не менее 28 при использовании FastQC и Trimmomatic 0.36 (Andrews, 2010; Bolger et al., 2014). Полученные кластеры повторов сравнивались с версией транспозона, обнаруженной в интроне и консервативной последовательностью MESC-домена (Matetovich et al., 2016).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Филогенетические исследования амфипод надсем. *Gammaroidea*

Одни из наиболее древних обитателей Байкала – амфиподы сем. *Gammaroidea*. Надсемейство амфипод *Gammaroidea* на 40% состоит из эндемичных представителей и часто упоминается как пример адаптивной эволюции. Предки разных семейств попали в озеро в разное время и, таким образом, бокоплавы Байкала полифилетичны (Macdonald et al., 2005). При этом отдельные семейства зачастую формируют «букеты» близкородственных видов, что позволяет наблюдать разные степени генетического родства.

Получены нуклеотидные последовательности интрона  $\beta$ - субъединицы АТФ-синтазы длиной от 296 до 311 п.н. для 14 видов амфипод, принадлежащих четырем семействам: *Acanthogammaridae*, *Eulimnogammaridae*, *Micrurpodidae* и *Pallaseidae* (Рис. 7, Приложение. Таблица 1).

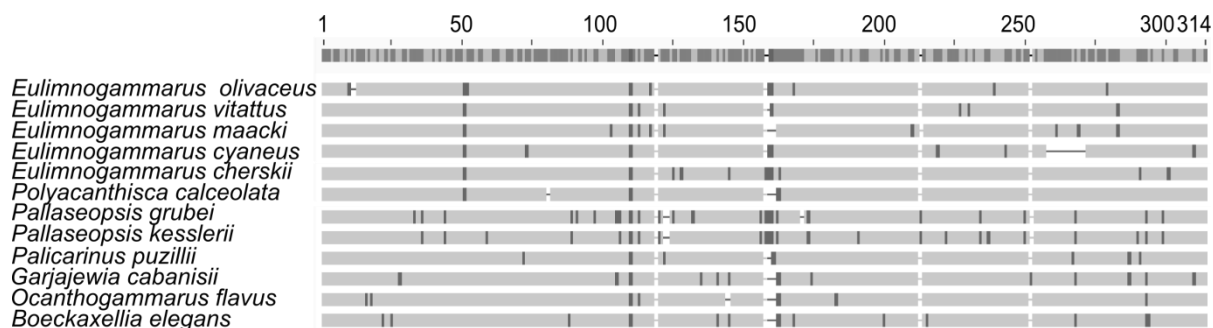


Рис. 7. Структура интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы амфипод сем. *Eulimnogammaridae*, *Acanthogammaridae* и *Pallaseidae*. Серым цветом показаны консервативные участки, черным – нуклеотидные замены и вставки.

Проведено сравнение генетических дистанций по уже имеющимся в GenBank митохондриальным маркерам (ген 16S рРНК и фрагмент гена первой субъединицы цитохром с-оксидазы (CO1) с генетическими дистанциями между последовательностями интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы.

Полиморфизм интрона сопоставим с полиморфизмом первых двух позиций кодона гена CO1 и почти вдвое ниже по сравнению с фрагментом 16S рРНК. Существуют высокие коэффициенты линейной корреляции между межвидовыми попарными генетическими дистанциями по последовательностям интронного и митохондриального маркеров: 0.76 ( $p=6.627e-08$ ) – интрон и первые две позиции кодона CO1 и 0.81 ( $p=1.021e-05$ ) – интрон и 16S рРНК (Рис. 8).

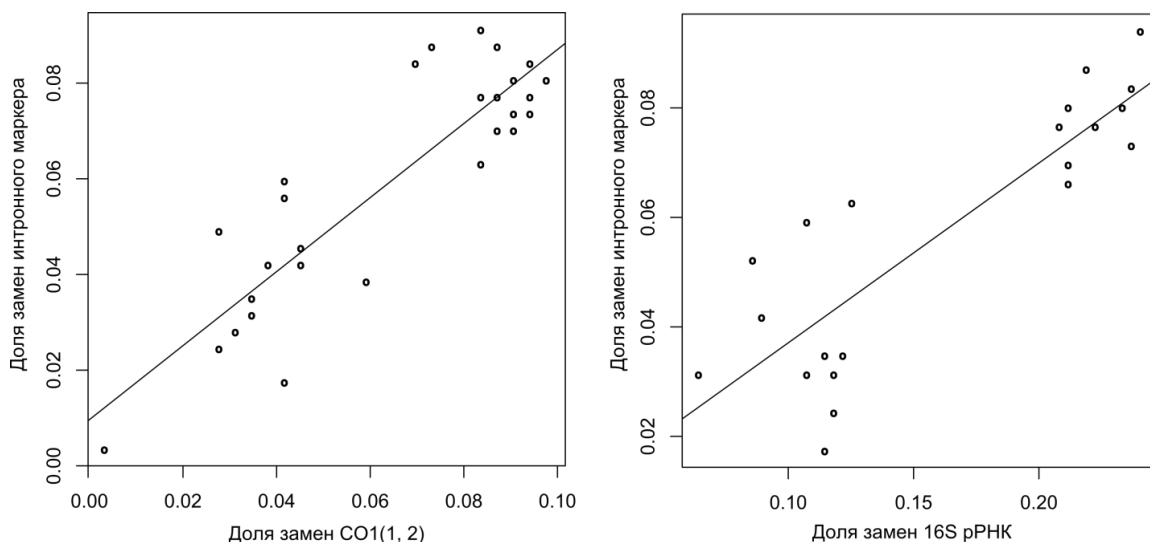


Рис. 8. Корреляции генетических дистанций амфипод по ядерному и митохондриальным маркерам.

При этом наиболее правдоподобные филогенетические деревья, построенные на основе нуклеотидных последовательностей интрона и фолмеровского фрагмента, полученные для аналогичных наборов таксонов Acanthogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae несколько отличаются (Рис. 9). Дерево, полученное на основании интронных последовательностей, в большей степени сходно с современной систематикой. Последовательности интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы представителей семейств Acanthogammaridae, Eulimnogammaridae и Pallaseidae содержат большое количество замен (достигая 18,2 %), в то время, как последовательности интрона представителей сем. Micropodidae (*Gmelinoides fasciatus* и *Linevichella vortex* (Dybowsky, 1874)) существенно отличаются от них, из-за чего выравнивание последовательностей всех четырех семейств невозможно.

Это связано с тем, что представители сем. Micrurpodidae относятся к более ранней волне колонизации Байкала амфиподной фауной, а происхождение остальных трех семейств связывается с формированием единого глубоководного водоема не ранее 10 млн. лет.

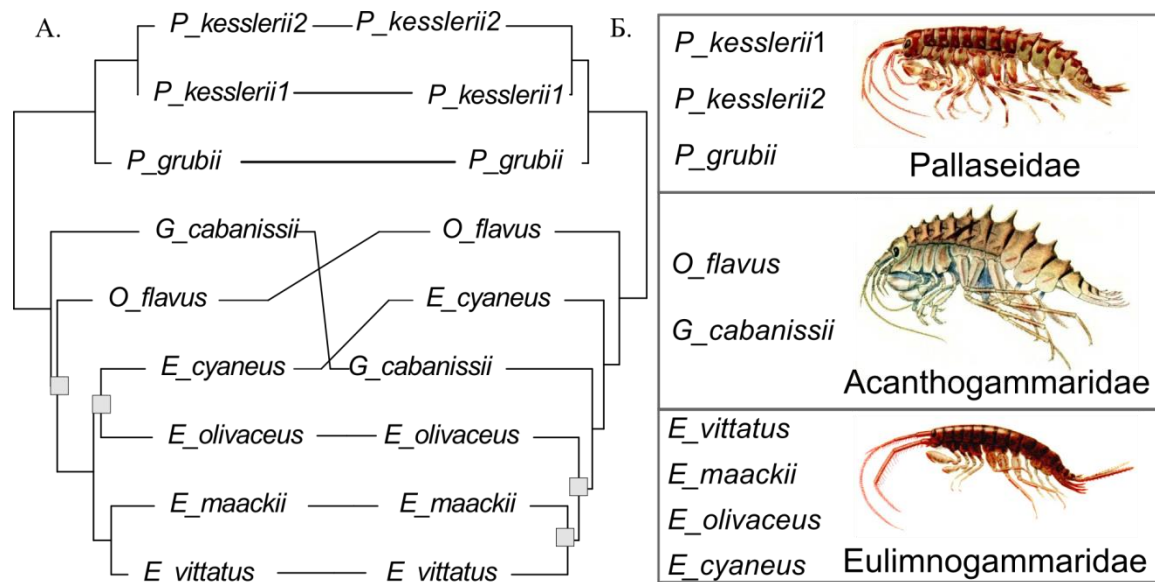


Рис. 9. Филограммы амфипод, полученные с использованием интронного (А) и фрагмента гена CO1 (Б). Серым— отмечены узлы с вероятностями менее 0.75. Иллюстрации бокоплавов В. Ч. Дорогостайского.

Несмотря на большое количество отличий, длина интрона почти одинакова у представителей разных семейств. Нуклеотидные замены неравномерно распределены в интроне. Анализ нуклеотидного разнообразия интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы представителей разных семейств амфипод по средством окна длиной 50 п.н. перемещающимся на 3 п.н. на межвидовом и внутривидовом уровне позволяет оценить локализацию наиболее консервативных участков (Рис. 10).

Наименьшие значения нуклеотидного разнообразия в интронах позволяют выявить сходные мотивы, которые имеют сходную локализацию в интроне разных семейств, возможное функциональное значение которых не ясно:

Acanthogammaridae,  
Eulimnogammaridae, Pallaseidae

AGTAAGAACGTTAAGTT

*G. fasciatus*

AGTGAAAACGCTAACTT

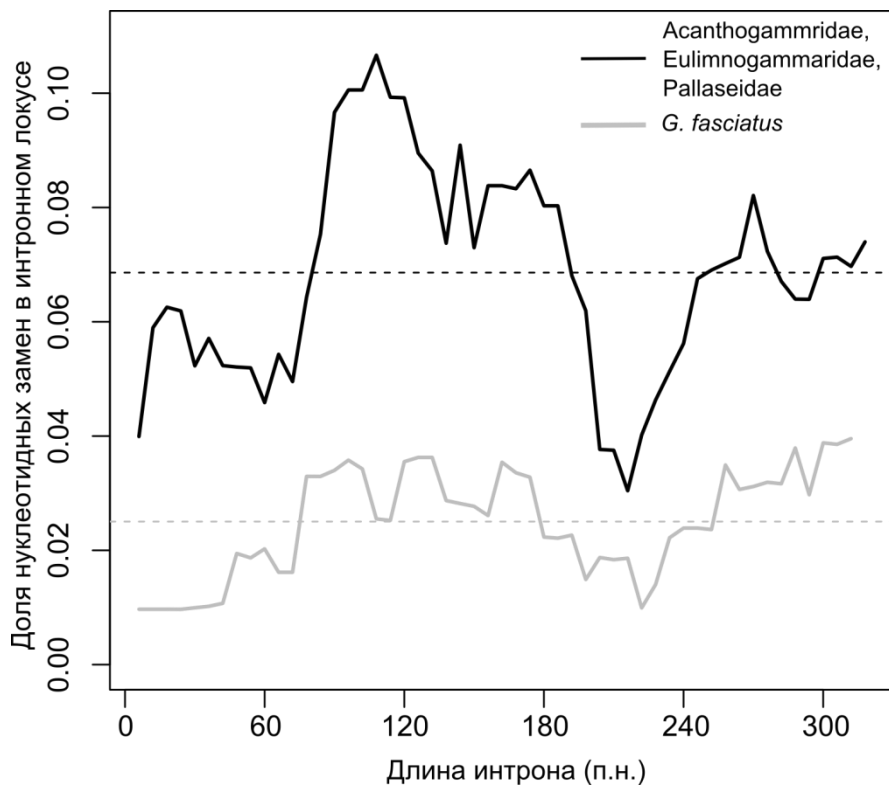


Рис. 10. Изменчивость интрона амфипод: черным – на уровне семейств, серым – на внутривидовом уровне. Пунктирные линии обозначают среднее значение нуклеотидного разнообразия.

Оба информационных критерия определяют как наиболее правдоподобную модель накопления нуклеотидных замен  $TRM1uf + G$ . Поскольку разность логарифмов вероятностей ( $-\ln L$ ) для моделей  $TRM1uf + G$  и  $HKY + G$  была меньше четырех по обоим критериям, то модель замен  $HKY + G$  также применима для расчета генетических дистанций.

Интронный маркер позволяет получить филогенетическое дерево, на котором виды сем. *Eulimnogammaridae* (представители родов *Eulimnogammarus* и *Polyacanthisca*) монофилетичны, а представители сем. *Pallaseidae* генетически отличаются от представителей сем. *Eulimnogammaridae* и *Acanthogammaridae* (Рис. 11).

Полученные данные главным образом соответствуют данным, полученным на основании транскриптомов шестидесяти четырех видов байкальских амфипод (Naumenko et al., 2017). Стремительная эволюция байкальских амфипод и противоречивость различных генетических маркеров в большинстве случаев не позволяют получить высоко-поддержанные клады.



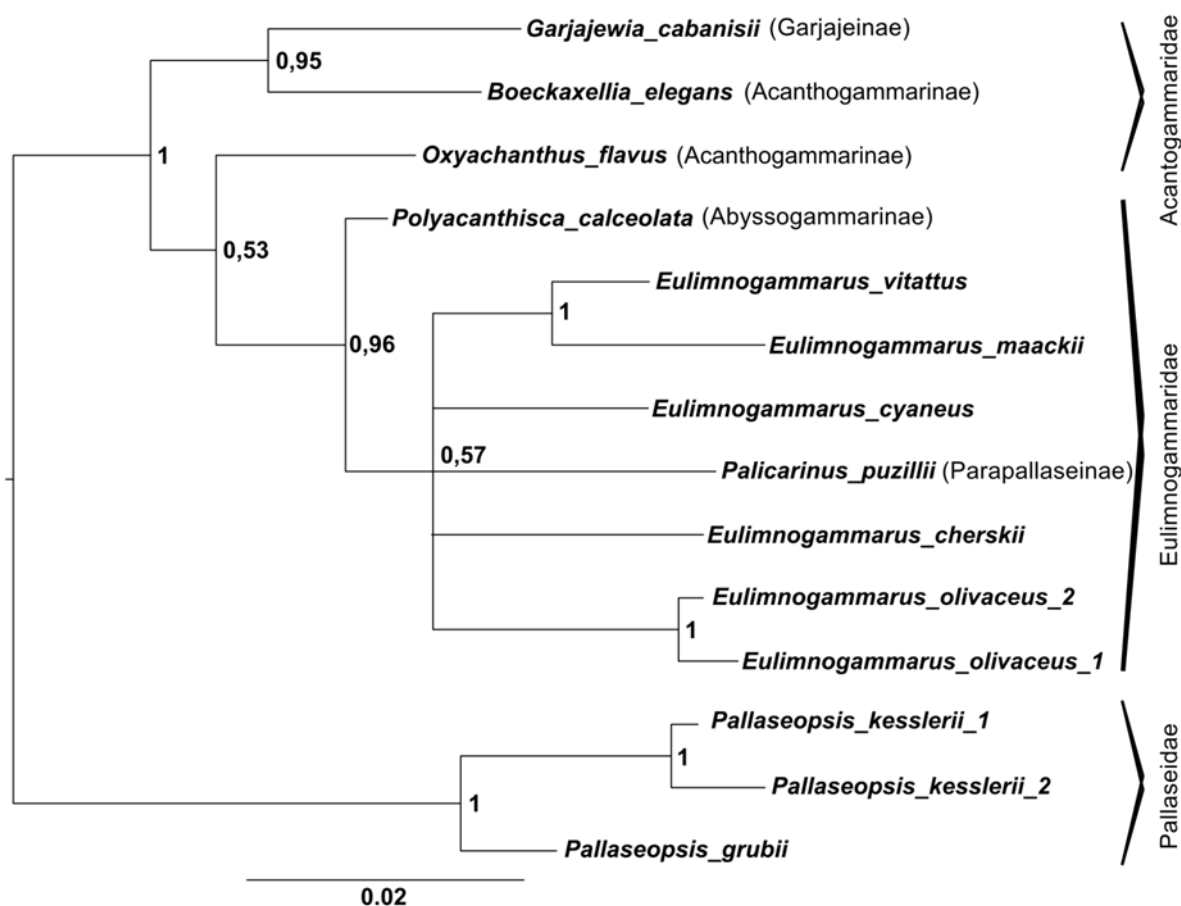


Рис. 11. Байесовское древо амфипод, полученное на основании последовательностей интрона гена  $\beta$ - субъединицы АТФ. В узлах указаны апостериорные вероятности.

### Генетическая структура амфипод *Gmelinoides fasciatus* в Байкале

Чтобы рассмотреть возможность применения интронного маркера на внутривидовом уровне, был выбран вид байкальских амфипод *Gmelinoides fasciatus*, для которого уже было проведено подобное исследование с помощью митохондриального маркера (Гоманенко и др., 2005). Населяя небольшие глубины, этот вид формирует своеобразный «ленточный ареал» по периметру озера.

В ходе исследования были получены 154 нуклеотидных последовательностей интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы *G. fasciatus* длиной 304 п.н и две последовательности *Linevichella vortex*. Для уточнения пространственной структуры и популяционной истории вида наряду с интронными последовательностями использовали 105 последовательностей

длиной 566 п.н. для фрагмента митохондриального гена CO1 (99 взяты из Genbank с номерами FJ715824-FJ715919, 6 получены для образцов м. Покойники и м. Зундук) (Приложение. Таблица 2).

Средняя дистанция между последовательностями интронного маркера составляет  $1.97 \pm 1.4\%$  нуклеотидных замен, что вдвое меньше в сравнении со средней вариабельностью митохондриального маркера CO1  $4.1 \pm 2.6\%$ . Генетические дистанции между уникальными аллелями интрона варьируют от 0.33 до 5.59%.

Форма распределения попарных внутривидовых дистанций по обоим маркерам подтверждает наличие популяционной структуры (Рис. 12).

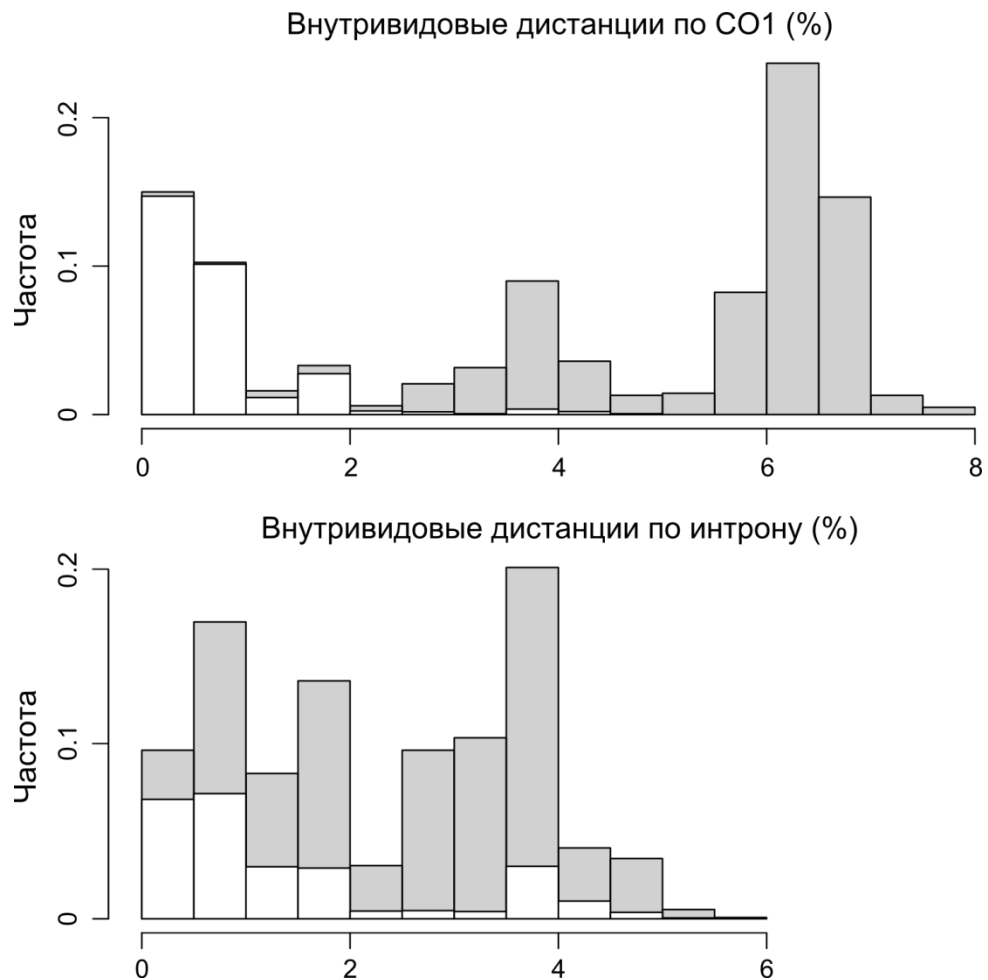


Рис. 12. Распределение попарных дистанций между аллелями CO1 и интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы из одной популяции (белый цвет) и разных популяций (серый цвет) *G.fasciatus*.

Значения большей части внутрипопуляционных генетических дистанций (96% - по последовательностям CO1 и 78% - по последовательностям интрона) составляют менее 2% нуклеотидных замен.

В результате поиска уникальных гаплотипов интрона были получены 52 уникальных аллеля, из них 30 встречаются однократно, десять дважды, четыре гаплотипа три раза, три гаплотипа 8 раз, один — 5, 7, 12, 15 и 27 раз (Рис. 13). При этом отмечается высокий уровень гетерозиготности по интронному фрагменту – 71.4% организмов в популяции.

В соответствии с полученными ранее данными, 45 уникальных митохондриальных гаплотипов принадлежат четырем кластерам: северному, юго-западному, юго-восточному и центральному. Два последних генетически наиболее близки и смешиваются на значительной части ареала вдоль восточного берега Центральной котловины (Рис. 14) (Гоманенко и др., 2005).

Интересно, что вдоль западного берега между станциями сбора м. Зундук и м. Покойники, расстояние между которыми около 80 км, перемешивание отмечено не было, что возможно связано с небольшим объемом выборки. Гаплотипы с м. Зундук принадлежат Юго-западному кластеру, а гаплотипы с м. Покойники – к Северному.

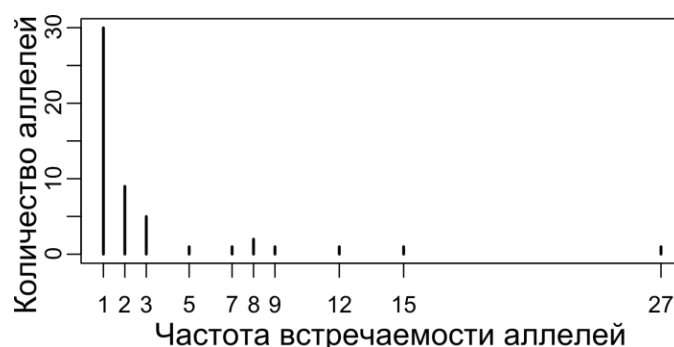


Рис. 13. Частоты встречаемости аллелей интрона *G. fasciatus*.

На медианной сети все гаплотипы интрона формируют 3 клады, отличающиеся друг от друга, по меньшей мере, шестью нуклеотидными заменами (Рис. 14).

В первую кладу входят 29 аллелей. Аллели этой клады были обнаружены на всех станциях сбора, кроме Баргузинского и Чивыркуйского

заливов. При этом в Северной котловине озера первая клада представлена только тремя близкородственными гаплотипами, которые не встречаются в остальных частях ареала. Один из этих аллелей преобладает в выборке, его носителями оказались 22% всех проанализированных животных.

Вторая клада содержит 16 аллелей, которые широко распространены в Северной котловине озера до м. Зундук вдоль западного берега, а также в Баргузинском и Чивыркуйском заливах до р. Безымянка.

Самая малочисленная клада содержит только четыре аллеля, которые были обнаружены в гетерозиготных организмах совместно с аллелями других клад, в четырех станциях сбора Среднего и Южного Байкала, достаточно удаленных друг от друга: г. Таланка, б. Бабушка, м. Боро-Елга, м. Зундук (Рис. 14).

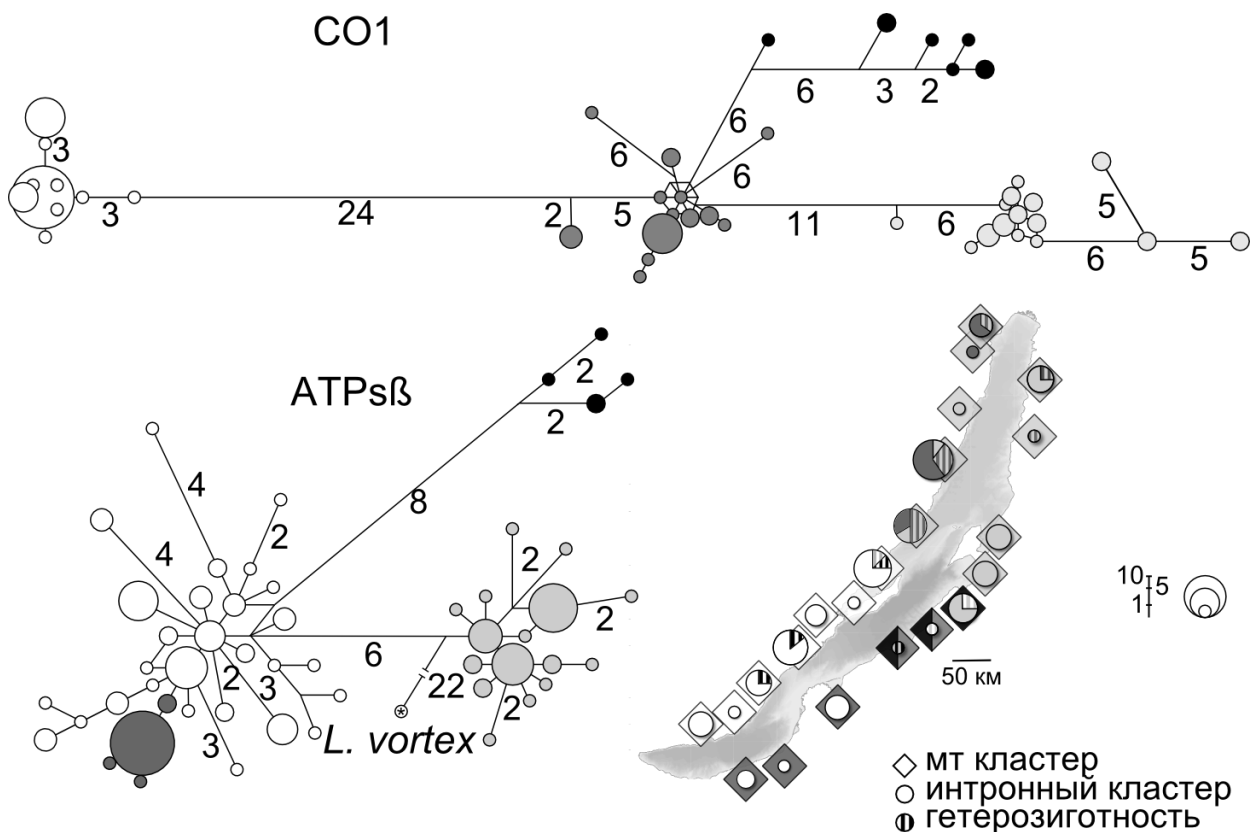


Рис. 14. Медианные сети по последовательностям митохондриального (CO1) и интронного (ATPsβ) маркеров и карта-схема мест сбора и частот аллелей *G. fasciatus* в Байкале. Размер кружков отражает частоту встречаемости аллелей интрона (деревья) и размер выборки (карта). Цифрами обозначено количество отличающихся нуклеотидов между аллелями. Звездочкой отмечен аллель аут-группы – *Linevichella vortex* (сем. Micruropodidae).

Наименьшая генетическая дистанция между последовательностью интрона *Linevichella vortex* и одним из центральных гаплотипов второй клады *G. fasciatus* составляет 7.6%, наибольшая — 12.9% с последовательностями 3 клады.

Пространственное распределение аллелей разных клад интронного маркера позволяет выделить две крупные географические зоны. Границы зон не являются резкими, а представляют гибридные зоны: (1) вдоль западного берега в районе северной оконечности Малого моря и (2) вдоль восточного берега Центральной котловины озера, где происходит смешивание аллелей разных клад в районе станций р. Максимиха и р. Безымянка (Рис. 14).

Принадлежность каждой станции сбора к той или иной популяции определялась на основании медианной сети гаплотипов. Станции г. Таланка и р. Безымянка были исключены из популяционного анализа по интронным последовательностям из-за недостаточного размера выборки. Кроме того, разделение на популяции тестировалось с помощью пространственного анализа молекулярной дисперсии в программе SAMOVA 2.0, поскольку программа предназначена для анализа двумерных популяционных структур, а ареал *G. fasciatus* линейный, принадлежность каждой станции сбора определялась с учетом того, что популяции географически непрерывны и не могут встречаться мозаично вдоль берега озера.

У одного из восьми животных из станции Зундук (северная оконечность Малого моря) обнаружен интронный аллель второй клады, однако общие аллели у особей собранных на м. Зундук и м. Покойники не были найдены, что может свидетельствовать о существовании барьеров для потока генов в этом районе. Восточную межпопуляционную границу локализовать сложнее, вероятно, вдоль восточного побережья Центральной котловины существует протяженная «гибридная зона».

Результаты теста AMOVA, проведенного для всех популяций, показали, что при разделении на четыре популяции: северо-западную, юго-западную,

юго-восточную и восточную, существенная часть внутривидового полиморфизма объясняется популяционной структурой (15%).

Выборки популяций достаточны для оценивания нуклеотидного разнообразия. Однако, разнообразие гаплотипов трех популяций, кроме Северо-западной, вероятнее всего, охвачено не полностью (Рис. 15).

Для исследования влияния процесса изоляции дистанциями был проведен тест Мантела: исследование корреляции между логарифмом географических дистанций и генетическими дистанциями, выраженными через  $F_{st}/1-F_{st}$  (Sokal, 1979; Diniz-Filho, 2013). Для данного анализа были выбраны только точки сбора, в которых проанализировано более одной особи (более четырех аллелей). Слабая корреляция между генетическими и географическими дистанциями оказалась недостоверной ( $r^2= 0.24$ ,  $p> 0.05$ ). Таким образом, можно сделать вывод, что изоляция обусловленная расстоянием не оказывает существенного влияния на формирование наблюдаемого полиморфизма.

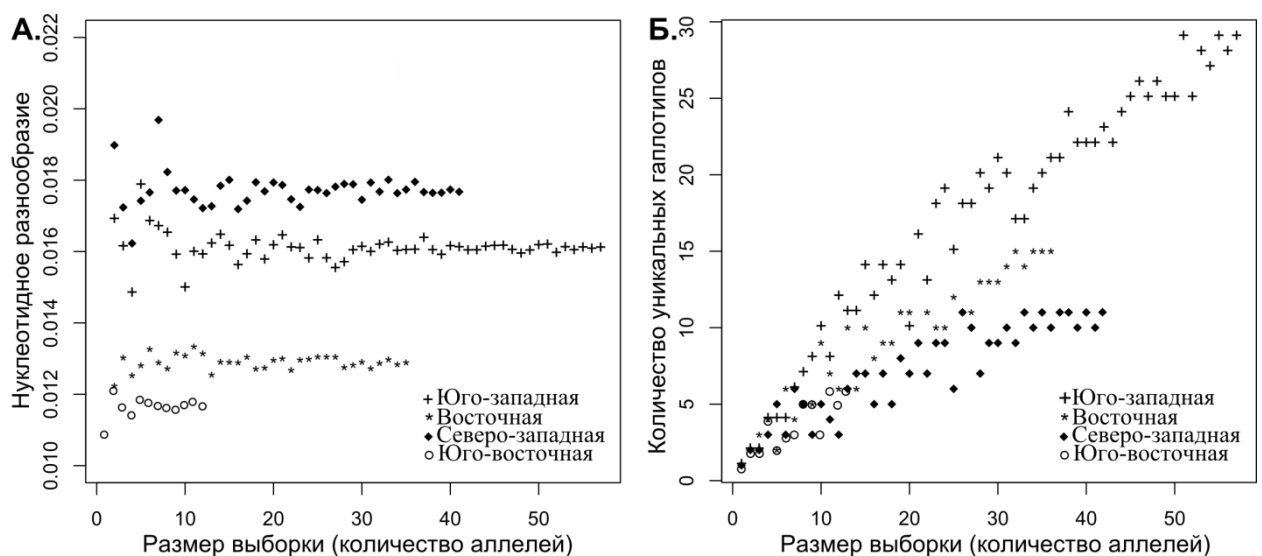


Рис. 15. Зависимость оценок нуклеотидного разнообразия (А) и количества уникальных гаплотипов интрона (Б) от количества проанализированных аллелей разных популяций *G. fasciatus*.

Значения статистических тестов Таджимы и Фу подтвердили отклонение от модели нейтральной эволюции для Юго-западной популяции

по обоим маркерам (значения критерия Таджимы:  $D=-1.70$  ( $p=0.001$ ) для последовательностей CO1 и  $D=-1.92$  ( $p=0.05$ ) для интронных последовательностей, а также тест Фу:  $F_s=-15.098$  ( $p<0.02$ ) для интрона), но не для других популяций.

Достоверно отрицательное значение H-статистики Фэя и Ву (FW-H=-25.68,  $p<0.001$ ) для юго-западного митохондриального кластера и недостоверные значения R2-теста указывают на то, что более вероятным эволюционным сценарием является действие движущего или стабилизирующего отбора на митохондриальный геном. В то же время значения обоих тестов оказались достоверны для последовательностей интронного фрагмента юго-западной популяции ( $R^2=0.049$ ,  $p<0.02$ ; FW-H=-10.29,  $p<0.02$ ).

Можно заключить, что митохондриальный геном юго-западной популяции действительно претерпел существенное селективное «подметание», что отчасти могло сказаться и на последовательностях гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы, продукт которого функционирует в составе белкового комплекса в матриксе митохондрий. Однако нуклеотидное разнообразие интронных последовательностей в юго-западной популяции очень высоко и уступает только полиморфизму северо-западной популяции, где смешаны аллели 1-й и 2-й клад.

В отличие от митохондриального интронный маркер демонстрирует лишь слабую, хотя и достоверную, дифференциацию между западным и восточным берегом южной котловины ( $F_{st}=0.08$  ( $p<0.05$ ) по сравнению с  $F_{st}=0.83$  ( $p<0.05$ )). Такое резкое отличие может быть связано с рядом причин, в том числе с воздействием отбора на митохондриальный маркер и сохранением интроном предкового полиморфизма.

Также некоторое отличие между данными генетических маркеров можно отметить в Северной котловине озера. Формированию отдельных популяций в разных котловинах могут способствовать различающиеся температурные режимы и, как следствие, разобщение циклов размножения.

По митохондриальным данным северная популяция генетически достаточно однородна и исключением служат особи из рек Кичера и Верхняя Ангара. Однако анализ интронного маркера позволяет разделить ее на западную и восточную части ( $F_{st}=0.278$ ,  $p<0.05$ ). Вероятнее всего, частоты аллелей 1 и 2 клад в Северной котловине озера имеют клинальную изменчивость: вдоль западного берега преобладает первая клада, вдоль восточного— вторая.

Западная популяционная граница выявляется по обоим маркерам и сходна с вероятными популяционными границами двух видов амфипод *Acanthogammarus lappaceus* и *A. maculosus*, распространение которых ограничивается лишь Северной и Центральной котловинами озера (Daneliya et al., 2011). Показано, что бентосная растительность служит основным источником пищи для *A. maculosus* (Yoshii, 1999), а *A. lappaceus* по данным Тахтеева отмечается преимущественно на каменистых грунтах с макрофитами, хотя в описании вида в качестве субстратов указывались только чистый и заиленный пески (Базикалова, 1945; Тахтеев, 2001). Частичная изоляция в районе западной границы у фитофильных видов может быть связана с практически полным отсутствием мелководной платформы на участках от м. Елохин до г. Заворотная и от м. Покойники до м. Кочериковский, где дно резко переходит в глубоководный склон, а фрагменты мелководной платформы при этом песчаные и, таким образом, малопригодны для макрофитов. Кроме того, Байкал в этой части лишен крупных притоков, которые могли бы стать источником пищи для детритофагов.

Предполагаемая граница на восточном берегу озера почти совпадает с границей ареалов сестринских видов литофильных гастропод *M. herderiana* и *M. variesculpta* (Ситникова, 2004). Вдоль восточного берега Центральной котловины для *G. fasciatus* барьером могут быть протяженные песчаные бухты, подверженные интенсивному ветро-волновому воздействию.



Пространственно-генетические структуры *G. fasciatus* в Байкале, полученные при анализе последовательностей фрагментов митохондриального (ген цитохром с-оксидазы) и ядерного геномов (интрон гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы) демонстрируют значительное сходство. Отличия в количестве генетических кластеров у *G. fasciatus* выявленных по двум маркерам можно объяснить тем, что даже некодирующие ядерные последовательности изменяются медленнее, чем митохондриальные гены, а сохранение предкового полиморфизма более вероятно в ядерном геноме. Кроме того, получены подтверждения действия отбора на митохондрию и интронный фрагмент в южной части ареала.

Интронный маркер позволяет выявить интенсивное перемешивание разных генетических кластеров там, где уже произошло разделение митохондриальных линий, что может быть как следствием сохранения предкового полиморфизма, так и однонаправленной гибридизацией прежде изолированных популяций. Ядерно-цитоплазматические несоответствия, возникающие в результате сохранения предкового полиморфизма, редко имеют четкие биогеографические паттерны, и смешение аллелей разных линий преимущественно на границах региональных популяций можно рассматривать как доказательство вторичного контакта.

Существующая популяционная структура могла начать формироваться во время последних оледенений (Ламакин, 1963) и поддерживаться в дальнейшем, за счет экологических и ландшафтных особенностей ареала, что позволяет наблюдать схожие пространственно-генетические паттерны у *G. fasciatus* и ряда других байкальских беспозвоночных, однако формирование неполной репродуктивной изоляции между популяциями также возможно.

## Филогенетическое исследование моллюсков подсем. *Baicaliinae*

### Выбор маркера молекулярной эволюции

Одни из ярчайших представителей байкальской эндемичной фауны – моллюски подсем. *Baicaliinae*. Несмотря на то, что эволюционный возраст этой группы исчисляется несколькими миллионами лет, моллюски этого подсемейства существенно различаются по своим морфологическим и экологическим признакам, что позволяет предполагать «взрывное видообразование» в соответствии с субстратными предпочтениями и стремительную морфологическую эволюцию данной группы. Для исследования филогенетических отношений эволюционно относительно молодой группы байкальских моллюсков необходимо использование достаточно вариабельных последовательностей, поэтому предварительно были протестированы три пары праймеров, позволяющих проводить амплификацию фрагментов генов, содержащих интроны.

Определены нуклеотидные последовательности трех интронов ядерных генов трех видов байкалийн: единственные интроны генов  $\alpha$ - и  $\beta$ - субъединиц АТФ-синтазы, а также интрон гена белка родственного hsc-70 (heat shock cognate protein) (Рис. 16).

На количество отличающихся сайтов, а, следовательно, и информативность каждого маркера, влияет, в первую очередь, его длина за вычетом инделов (поскольку протяженные делеции могут значительно снижать информативность маркера), а также его мутационная скорость, которая обычно определяется эффектом положения: гены с более консервативными кодирующими последовательностями, вероятнее всего, будут иметь и более консервативные интроны.

Интрон гена белка родственного hsc-70 длиной от 346 до 446 п.н. имеет наиболее консервативные последовательности: у трех видов байкалийн *B. dybowskiana*, *B. turriiformis* и *L. steidae* он отличается только четырьмя

нуклеотидными заменами (1.16% замен) и двумя относительно протяженными делециями у *L. steidae* 21 и 78 п.н.

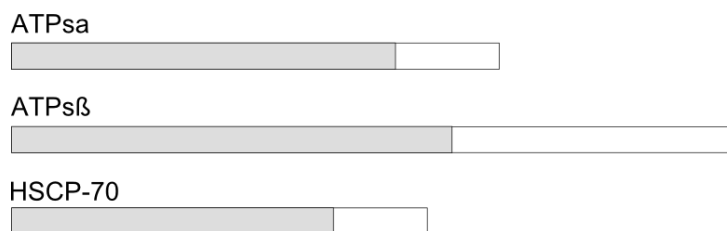


Рис. 16. Изменчивость длин интронов трех видов моллюсков подсем. *Baicaliinae*. Белым цветом отмечена часть интрона содержащая инделы.

Для аналогичного набора видов изменчивость интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы выше в 3.5 раза, а интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы – в 2 раза. По причине невысокой вариабельности и большой вероятности получения неспецифичных продуктов амплификации для дальнейших филогенетических исследований были выбраны два интронных маркера с большей вариабельностью.

### **Интрон гена $\beta$ - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. *Baicaliinae*. Структура диспергированного повтора**

В ходе изучения механизма изменения длин интронов были определены последовательности интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы двенадцати видов байкалийн. Длина интрона варьирует от 474 до 777 п.н. за счет протяженных делеций у *L. steidae* и *T. ciliata* (Рис. 17).

С помощью программы tRNAscan-SE Search (Lowe, Eddy, 1997) в интроне гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы в позиции 293-365 выявлен псевдоген тРНК. Последовательность псевдогена тРНК демонстрирует значительное сходство с неаннотированными геномными последовательностям разных беспозвоночных, но она сильно вырождена, из-за чего не удастся установить исходный ген тРНК (Рис. 18).

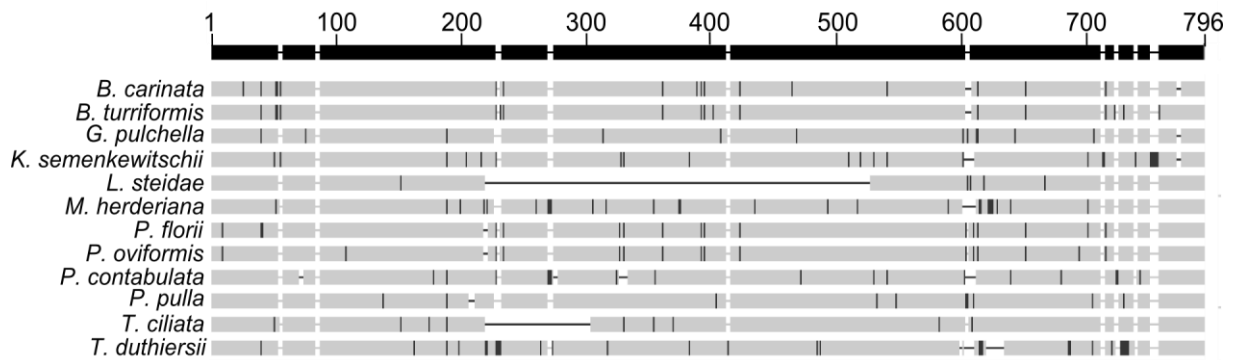


Рис. 17. Структура интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы двенадцати видов байкалийн. Серым цветом отмечены консервативные участки, черным – нуклеотидные замены и вставки.

Последовательность интрона в позиции 385-600 на 80% совпадает с фрагментом последовательности RAPD-маркера BF-KKU *Bithynia funiculata* (надсем. Rissooidea, инфраотряд Littorinimorpha) (JF784168), в позиции 444-610 на 71% совпадает с фрагментом минисателлитной последовательности П-3 *Strombus gigas* (надсем. Stromboidea, инфраотряд Littorinimorpha) (AY707889), а с 444 по 603 п. н. приблизительно на 77% сходна с фрагментами неаннотированных последовательностей ДНК *Littorina saxatilis* (надсем. Littorinoidea, инфраотряд Littorinimorpha) (CT476813.18, ST027673.30, CR974470.8), где эта последовательность встречается 8 раз на расстояниях в несколько десятков тысяч пар нуклеотидов друг от друга, на разных цепях (Рис. 18).

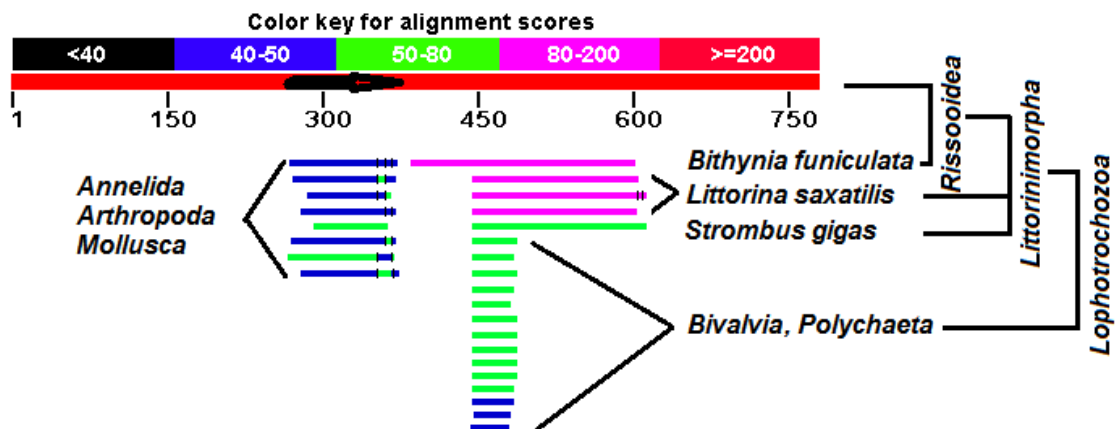


Рис. 18. Диаграмма структуры сходства последовательностей по результатам BLASTn-анализа интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы. Стрелкой показан псевдоген тРНК.

Районы интрона с 277 по 289 и с 605 по 617 представлены прямым 13-ти буквенным повтором (AAGCAAAACTTGA). Структура обнаруженного элемента позволяет отнести его к SINE-элементам (Short Interspersed Nuclear Element) (Рис. 19).

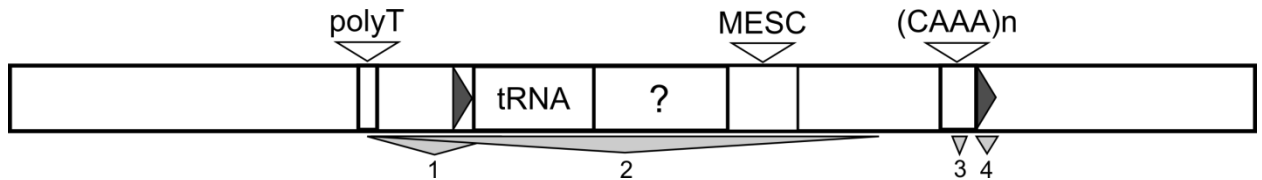


Рис. 19. Структура ретротранспозона в составе интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков. Делеции показаны серыми треугольниками 1 - *T. ciliata*; 2 – *L. steidae*, 3 – *K. semenkewitschi*, *M. herderiana*, *P. contabulata*, *T. duthiersii*; 4 – *T. duthiersii*. Предполагаемый полипиримидиновый тракт интрона (polyT), сигнал полиаденилирования транспозона (CAAA) и псевдоген тРНК (tRNA). Черные стрелки – 13-ти буквенный повтор.

В соответствии с данными о структурах известных SINE-повторов, за тРНК-родственным 5'-концом следует изменчивая область неизвестного происхождения, консервативный центральный домен и аденин-богатый 3'-конец. Зачастую подобные элементы оказываются родо- или филоспецифичны, однако на основании идентичности наиболее консервативного из их доменов, последовательности могут объединяться в семейства или суперсемейства, которые могут быть обнаружены в разных группах организмов.

В 2016 году вышеупомянутые диспергированные повторы *Littorina saxatilis* были описаны сразу двумя группами исследователей как повторы Lsa1 и LitSINE1 (Matetovici et al., 2016; Nishihara et al., 2016). А на основании сходства их консервативных доменов с другими повторами были описаны два суперсемейства SINE: MESC-суперсемейство обнаруженное у двустворчатых и брюхоногих моллюсков (Matetovici et al., 2016), и Meta-суперсемейство многоклеточных животных (Nishihara et al., 2016). Размер консервативного домена повторов составил около 80 п.н для MESC-домена и 66 п.н. – для Meta-домена, что связано с тем, что во втором исследовании были взяты 13 видов животных от кишечнополостных до костистых рыб. Также

обеими группами исследователей были обнаружены сходные типы повторов у двустворчатых моллюсков (BivaV-SINE1, BivaV-SINE2, и BivaCORE-SINE2).

Интересно, что в рассматриваемой копии повтора у байкалийин с MESC и Meta доменами совпадает лишь фрагмент около 40 п.н. (что соответствует второй половине MESC-домена), однако предшествующая часть, начиная с В-промотора тРНК, сходна лишь с последовательностью RAPD-маркера из *Bithynia funiculata* (Rissooidea (Gray, 1847)), которая, по всей видимости, представляет собой усеченную с 5'-конца копию подобного повтора.

Тот факт, что консервативный домен представлен в структурах этих элементов не полностью, позволяет предполагать существование сходного с MESC семейства повторов у моллюсков подсем. Baicaliinae, поскольку ранее перекрывание консервативных центральных доменов уже было показано для нескольких суперсемейств SINE (Matetović et al., 2016). Ретротранспозон, по всей видимости, был встроен в АТ-богатый участок, который расположен за 8 до и 30 пар оснований после 13-буквенного повтора.

Засчет сходства второй половины консервативного домена MESC фрагмент интрона с 444 по 486 п. н. на 80-90% схож с фрагментами микросателлитных маркеров двустворчатых моллюсков и полихет *Branchiopolynoë seepensis*, обитающих в мантийной полости двустворчатых моллюсков (надтип Lophotrochozoa).

По особенностям описанной структуры можно сделать вывод, что весь этот регион длиной 340 п.н. (277- 617 п. н.) является копией MESC-родственного ретротранспозона (Рис. 19), поскольку в последовательности псевдогена тРНК присутствуют менее вырожденные А- и В-боксы, формирующие внутренний промотор тРНК, однако последовательность промотора нарушена (Рис. 20). Ретротранспозоны Lsa1 (7 из 8) *Littorina saxatilis* также содержат псевдоген тРНК предшествующий повтору, который лишь на 68% идентичен обнаруженному нами псевдогену тРНК. Изменение

доменов, содержащих промотор, считается довольно частым событием в эволюции коротких диспергированных повторов (Matetovici et al., 2016).

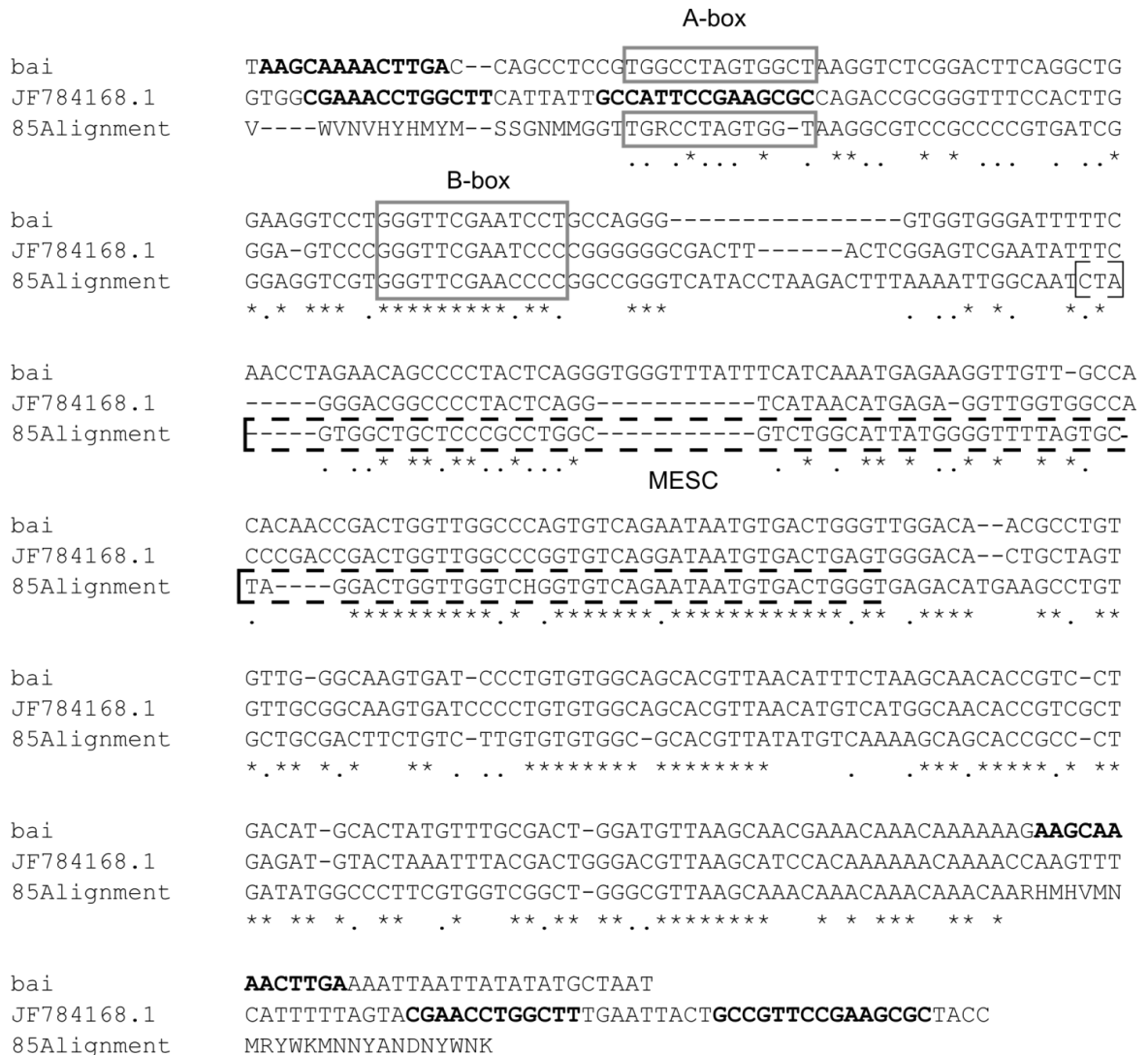


Рис. 20. Множественное выравнивание консенсусных последовательностей (85%) ретротранспозона из интрона байкалийн, фрагмента RAPD-маркера *Bithynia funiculata* и консенсуса семи повторов семейства Lsa1. Фланкирующие повторы выделены жирным шрифтом. MESC-домен показан пунктиром, А и В-боксы промотора показаны рамками.

Для того, чтобы убедиться, что рассматриваемая структура действительно является диспергированным повтором и многократно встречается в геноме, был проведен поиск сходных повторов в данных полученных методом высокопроизводительного секвенирования с помощью системы Illumina HiSeq2000 с длиной прочтения 100PE (Illumina, San Diego, CA).

Библиотеки ридов трех видов байкальских ценогастропод были использованы для поиска высокоповторенных в геноме последовательностей с помощью программы RepeatExplorer (Novák et al., 2013).

В результате были получены три кластера контигов (по одному у каждого из трех видов), сходные на 93-96% с последовательностью повтора из интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы. Большая часть отличий между разными копиями повтора локализуется в повторах (CAAA)<sub>3-4</sub> или (CAAC)<sub>4-5</sub> на 3'-конце копий элемента.

Повторы этого типа в геномах *B. turriiformis*, *M. herderiana* и *K. semenkewitschi* по предварительным оценкам составляют от 0.46 до 0.68%. Таким образом, предполагаемая представленность этого кластера в геноме (оценивается как глубина покрытия\*длина повтора) близка к полумиллиону копий в геноме.

Для полученных контигов был проведен поиск последовательностей сходных с референсными версиями повтора (версией из интрона и непосредственно MESC-домена). Для всех сходство с транспозонами MESC-домена ниже, что позволяет предполагать отсутствие в геномах байкалийн таких транспозонов.

Известно, что короткие транскрибируемые повторенные элементы могут осуществлять регуляцию экспрессии посредством различных механизмов, включая повышение стабильности транскриптов (Chen, Carmichael, 2009), активацию деградации РНК посредством межмолекулярных взаимодействий (Gong, Maquat, 2011; Luo et al., 2013; Pek et al., 2015), а также создание или разрушение регуляторных элементов транскрипции и сплайсинга пре-мРНК (Taniguchi-Ikeda et al., 2011). Кроме того, транскрипты SINE-элементов могут регулировать экспрессию генов посредством прямого связывания с транскрипционными белками (Mariner et al., 2008).

Перемещение ретротранспозонов может влиять не только на экспрессию генов, но и на возникновение крупных хромосомных перестроек, посредством рекомбинации повтор-содержащих последовательностей.



Предполагается, что некоторые неавтономные мобильные элементы могут способствовать распространению микросателлитных повторов в геномах моллюсков через сцепленное наследование и играть более значительную роль в перестройке генома, чем автономные мобильные элементы (McInerney et al., 2011).

Ранее было показано, что мобильные элементы зачастую способствуют появлению достаточно протяженных вставок и делеций. Например, возникновение размером более 10% специфичных для генома человека инделов более 100 п.н. связывается с событиями, связанными с мобильными элементами (Xing et al., 2009).

По всей видимости, внедрение мобильных элементов и их последующая инактивация являются частью формирования изменчивости длин интронов, что делает их удобными маркерами, не требующими секвенирования.

У *Liobaikalia steidae* присутствует делеция с 219 по 520 п.н. интрона и остался лишь небольшой фрагмент повтора. Кроме того, делетированный участок также содержал и вероятный полипиримидиновый участок. У *Teratobaikalia ciliata* также отсутствует протяженный фрагмент интрона участок с 219 по 304 п.н.

Количество варибельных сайтов в последовательности ретротранспозона даже немного выше, чем в окружающем интроне (15.3% и 9.1% нуклеотидных замен, соответственно), за счет большого количества аутапоморных мутаций в концевом СААА-повторе ретротранспозона.

### **Инtron гена $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы как маркер эволюционных процессов у байкалийн**

Топологии деревьев по последовательности транспозона и оставшейся части интрона очень сходны, что, вероятно, свидетельствует о том, что ретротранспозон встроился в этот интрон один раз и уже присутствовал в

нем к началу дивергенции байкалин, а активность в разных линиях мог потерять позднее.

Филогенетическое дерево было построено байесовским методом по полной последовательности интрона с двухпараметрической моделью накопления нуклеотидных замен с гамма-коррекцией для последовательности транспозона, и моделью Хасегавы-Кишино-Яно с гамма-коррекцией – для остальных частей интрона.

На полученном древе, укорененном по средней точке, все последовательности делятся на две группы. Во внутреннем узле содержится политомиа, а разрешенные узлы имеют невысокие апостериорные вероятности, единственное исключение— это клада, содержащая виды, принадлежащие родам *Baicalia* и *Parabaikalia* (Рис. 21). Полученные кластеры лишь отчасти соответствуют существующей систематике (положение сестринских видов) и противоречат экологическим сведениям, поскольку псаммофильные и литофильные виды перемешиваются.

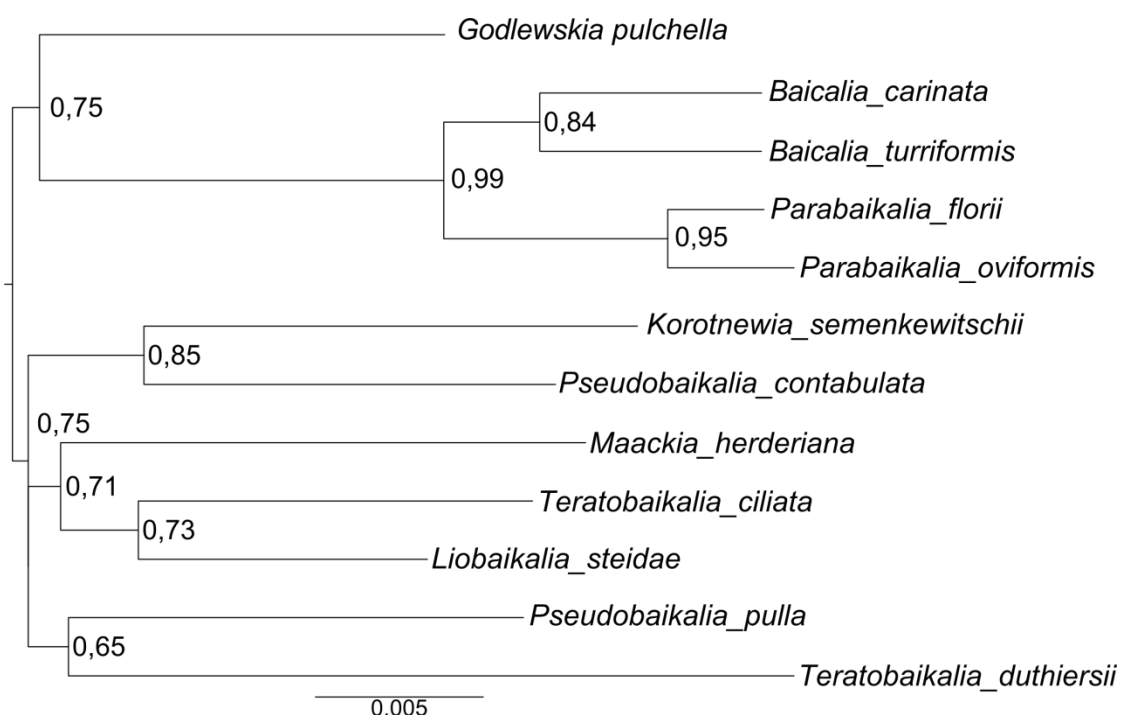


Рис. 21. Укорененное по средней точке байесовское дерево 12 видов байкалийн на основе последовательностей интрона гена  $\beta$ - субъединицы АТФ-синтазы. В узлах указаны апостериорные вероятности.

Таким образом, можно заключить, что данный интрон может использоваться как дополнительный маркер эволюции байкалийн, но при этом необходимо дополнительное исследование его на соответствие нейтральной модели эволюции из-за присутствия в нем ретротранспозона, потенциальной мишени отбора.

### **Интрон гена $\alpha$ - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. Baicaliinae**

В качестве более нейтрального маркера эволюции далее использовался интрон гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы.

Определены нуклеотидные последовательности интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы для представителей двадцати одного вида из всех восьми родов эндемичных байкальских моллюсков подсем. Baicaliinae (Приложение. Таблица 3). Полученные последовательности частично экспонированы в Genbank с номерами KF201695-KF201709.

Длина этого интрона варьирует от 466 до 524 п. н. у моллюсков разных видов благодаря многочисленным, но обычно не протяженным, вставкам и делециям. Единственная обнаруженная крупная делеция у *Pseudobaikalia michelae* sp. n. – 57 п.н. (Рис. 22).

Практически все инделы являются в данном случае аутапоморфными мутациями и не несут значимого филогенетического сигнала. Однако некоторые вариации длины данного интрона, вероятно, могут быть использованы для быстрого видового определения ряда сестринских видов. Только два из наблюдаемых инделов обнаружены у нескольких представителей разных видов: один — у *M. herderiana* и *P. dubiosa*, а другой — у *P. kobeltiana* и *T. ciliata*. На внутривидовом уровне выявлен полиморфизм длины интрона для представителей видов *Korotnewia semenkewitschi*, *Teratobaikalia duthiersii* и *T. ciliata* из разных мест сбора.

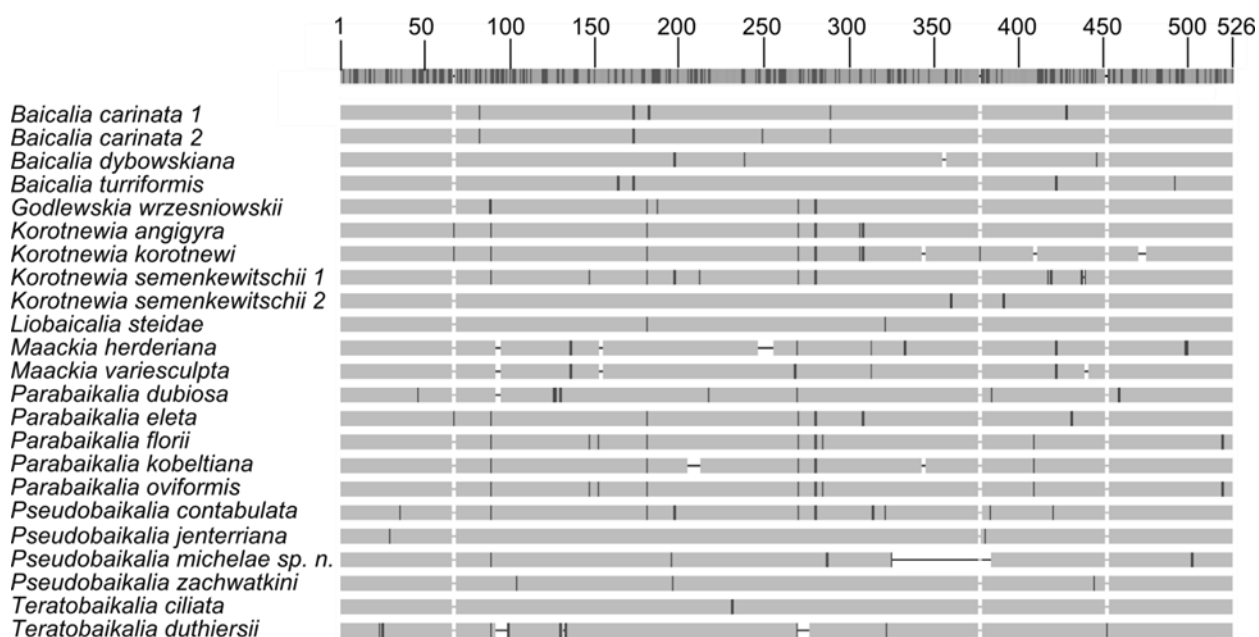


Рис. 22. Структура интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы двадцати одного вида байкалийн. Серым цветом отмечены консервативные участки, черным – нуклеотидные замены и вставки.

Последовательности интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы содержат 52 переменных сайта (12.4% от всей длины интрона после исключения всех гэпов), при этом только 4.1% информативны. Отношение числа транзиций к трансверсиям приблизительно равно единице. Показано, что чуть менее четверти интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы байкалийн занимают различные тандемные повторы от 5 до 9 п.н., которые также могут быть незначительно (в пределах десятка п.н.) удалены друг от друга (Рис. 23).

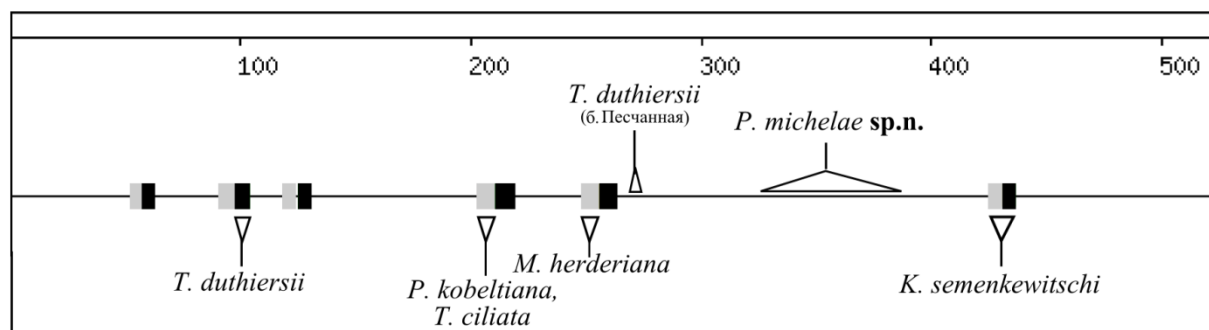


Рис. 23. Положение инделов и коротких парных повторов в интроне гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы. Мономеры парных повторов показаны серым и черным цветом, инделы-треугольниками.

В интроне гена  $\alpha$ - субъединицы АТФ-синтазы четыре из шести делеций размером более 6 нуклеотидов связаны с потерей одного из мономеров в тандемно повторенной последовательности или, в одном из случаев, всего повтора полностью (Рис. 23). На примере несовершенных повторов можно предположить, что делетируется обычно первая часть повтора (Рис. 24).

Среднее значение межвидовой генетической вариабельности этого интрона почти в три раза ниже такового для фолмеровского фрагмента гена цитохром с-оксидазы (Рис. 25).

ВИД	Н.П.	200	210	220	230	240	250	260
<i>Baicalia carinata</i> 1		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Baicalia carinata</i> 2		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGCAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Baicalia rugosa</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGCAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Godlewskia wrzeniowskii</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Korotnewia angigyra</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Korotnewia semenkewitschi</i>		AGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Maackia herderiana</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTA-----TGATTTTGC	GGAC					
<i>Parabaikalia kobeltiana</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Parabaikalia florii</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Parabaikalia elata</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Pseudobaikalia pulla tenuicostata</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					
<i>Teratobaikalia duthiersii</i>		GGTACACATATATTGATATATTGAAGCCACAGAAGGGAGATTGCAACCTATGAATTTGCTGATTTTGC	GGAC					

Рис. 24. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей интрона  $\alpha$ - субъединицы АТФ-синтазы моллюсков семейства *Baicaliidae* с учетом вторичной структуры. Рамками отмечены тандемные повторы с расположенными в них инделами ((A)TATATTGA)<sub>2</sub> и (TGAWTTTGC)<sub>2</sub>.

Отмечено неполное разделение предковых линий интронного маркера моллюсков подсем. *Baicaliinae*. У трех видов: *Teratobaikalia ciliata* (2 из 4 аллелей ок. р. Ледяная), *Pseudobaikalia jenterriana* (2 из 4 аллелей из Ольхонских ворот), *Pseudobaikalia zachwatkini* (одна из четырех аллелей из Листвянки) был обнаружен общий аллель, занимающий центральное положение на медианной сети гаплотипов интрона байкалийн.

Некоторые последовательности аллелей видов *Korotnewia angigyra* и *K. korotnewi* также не содержат ни одной нуклеотидной замены, хотя и отличаются друг от друга наличием четырех вставок и делеций.

Даже у морфологически хорошо различающихся видов генетическая дистанция по последовательностям интрона может быть невелика. Например, интроны *Korotnewia angigyra* и *Parabaikalia elata* отличаются лишь одной нуклеотидной заменой. Наибольшее генетическое расстояние составляет чуть

более 3.5% замен (16 нуклеотидных замен) для пары видов *Parabaikalia dubiosa* и *Pseudobaikalia contabulata*.

На основе расшифрованных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохром с-оксидазы и интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы байесовским методом, а также методом максимального правдоподобия были построены филогенетические деревья двадцати одного вида байкалийн. Инделы интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы были закодированы бинарно в соответствии с диаллельной моделью.

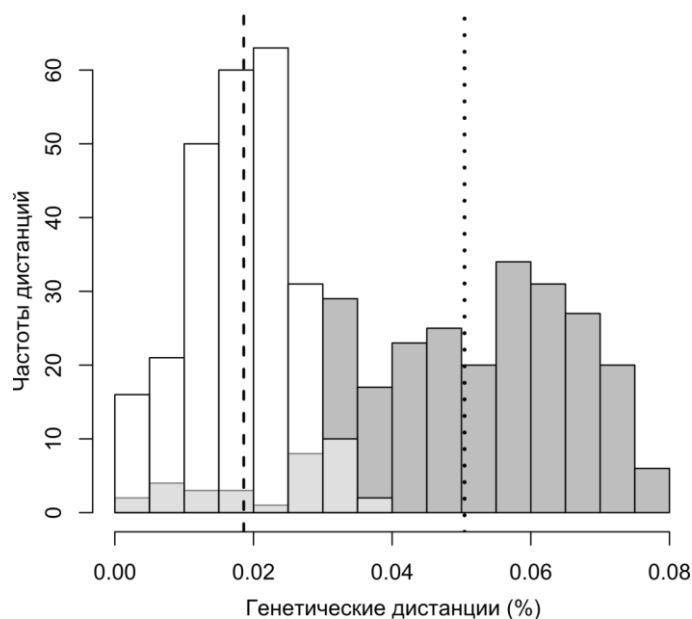


Рис. 25. Распределения попарных межвидовых генетических дистанций между последовательностями интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы (белый) и цитохром с-оксидазы (серый цвет) моллюсков. Пунктирными линиями отмечены средние значения для каждого из маркеров.

Наиболее правдоподобными моделями накопления нуклеотидных замен для обоих наборов данных является модель Хасегавы-Кишино-Яно (НКУ) с гамма-коррекцией для митохондриального маркера, и некорректируемая – для интронного маркера. В случае внутривидовой вариабельности по последовательностям интрона для каждого вида при построении деревьев выбирался «центральный» гаплотип, имеющий наименьшие генетические дистанции ко всем остальным гаплотипам вида.

Оба древа содержат базальные политомии (ближе к корню дерева), наибольшие статистические поддержки имеют узлы пар сестринских видов.

Сходство между двумя деревьями, построенными по разным маркерам, невелико и на первый взгляд заключается только в совместной кластеризации некоторых пар сестринских видов из родов *Baicalia*, *Korotnewia* и *Parabaikalia*. Однако существует достоверная корреляция между матрицами генетических дистанций по двум маркерам для двадцати одного вида байкалийн (значения Мантел-теста:  $r = 0.304$ ,  $p = 0.006$ ). Кроме того, на обоих деревьях кладами с высокими вероятностями объединяются близкие группы видов (отмечены на рисунках пунктиром) (Рис. 26, Рис.27).

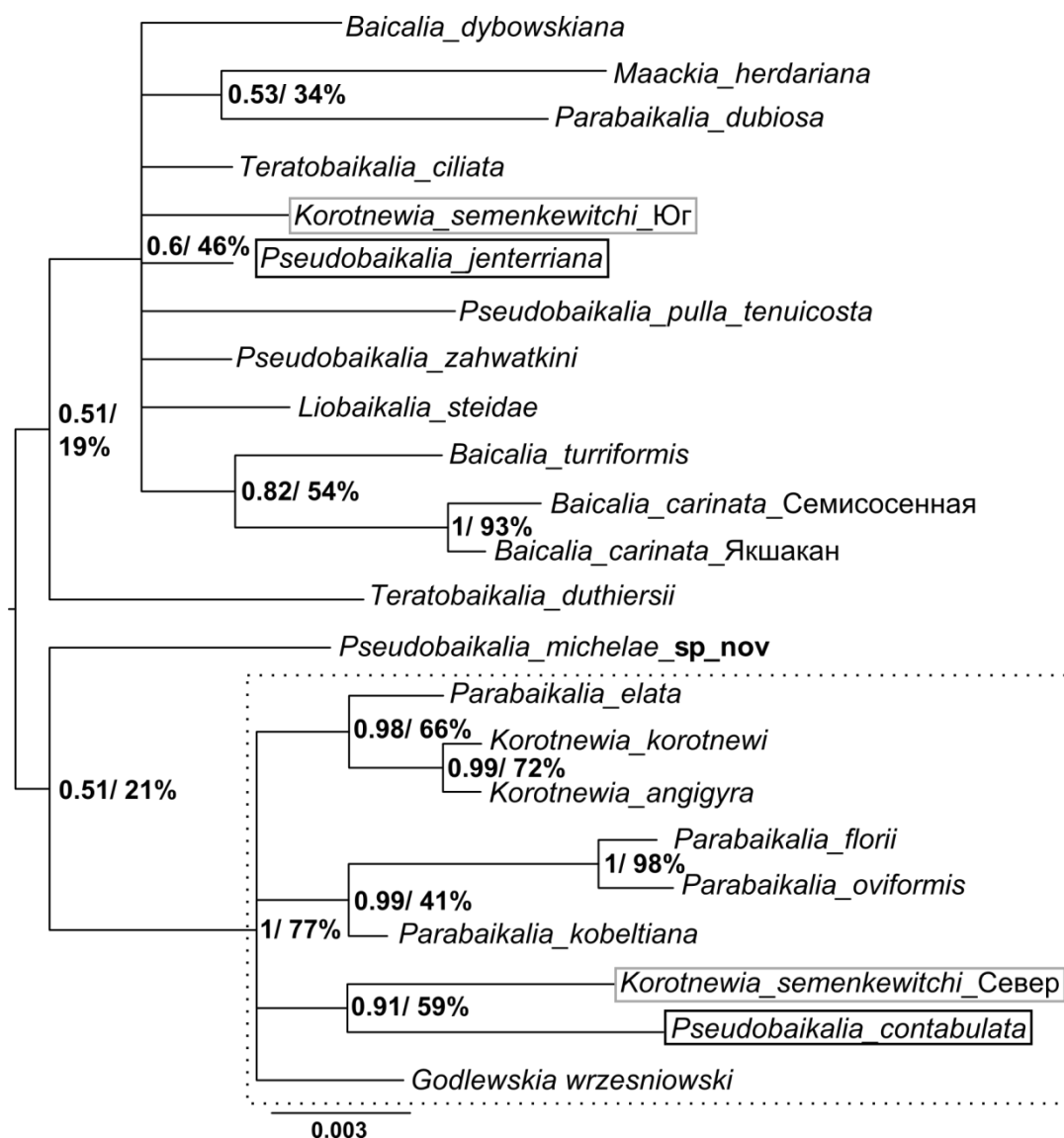


Рис. 26. Филогенетическое дерево байкалийн построенное на основе нуклеотидных последовательностей «центральных аллелей» интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы. Узлы со значениями апостериорных вероятностей менее 0.5 схлопнуты в политомии. Первое значение в узлах – апостериорные вероятности, второе – бутстреп-поддержки для ML-дерева.

В такую кладу (апостериорная вероятность = 1.00, бутстреп-поддержка = 77) на древе, построенном на основе нуклеотидных последовательностей интрона, входят 9 видов: представляющие полностью псаммофильные рода *Korotnewia* и *Parabaikalia*, за исключением *Parabaikalia dubiosa*, а также *Godlewskia wrzesnioskii* и *Pseudobaikalia contabulata*. На митохондриальном древе в схожую по составу кладу (апостериорная вероятность = 1.00, бутстреп-поддержка = 97) входят 11 видов: все виды родов *Korotnewia*, *Parabaikalia* и *Liobaikalia*, а кроме того 2 псаммофильных вида рода *Pseudobaikalia*: *P. pulla* и *P. zachwatkini*.

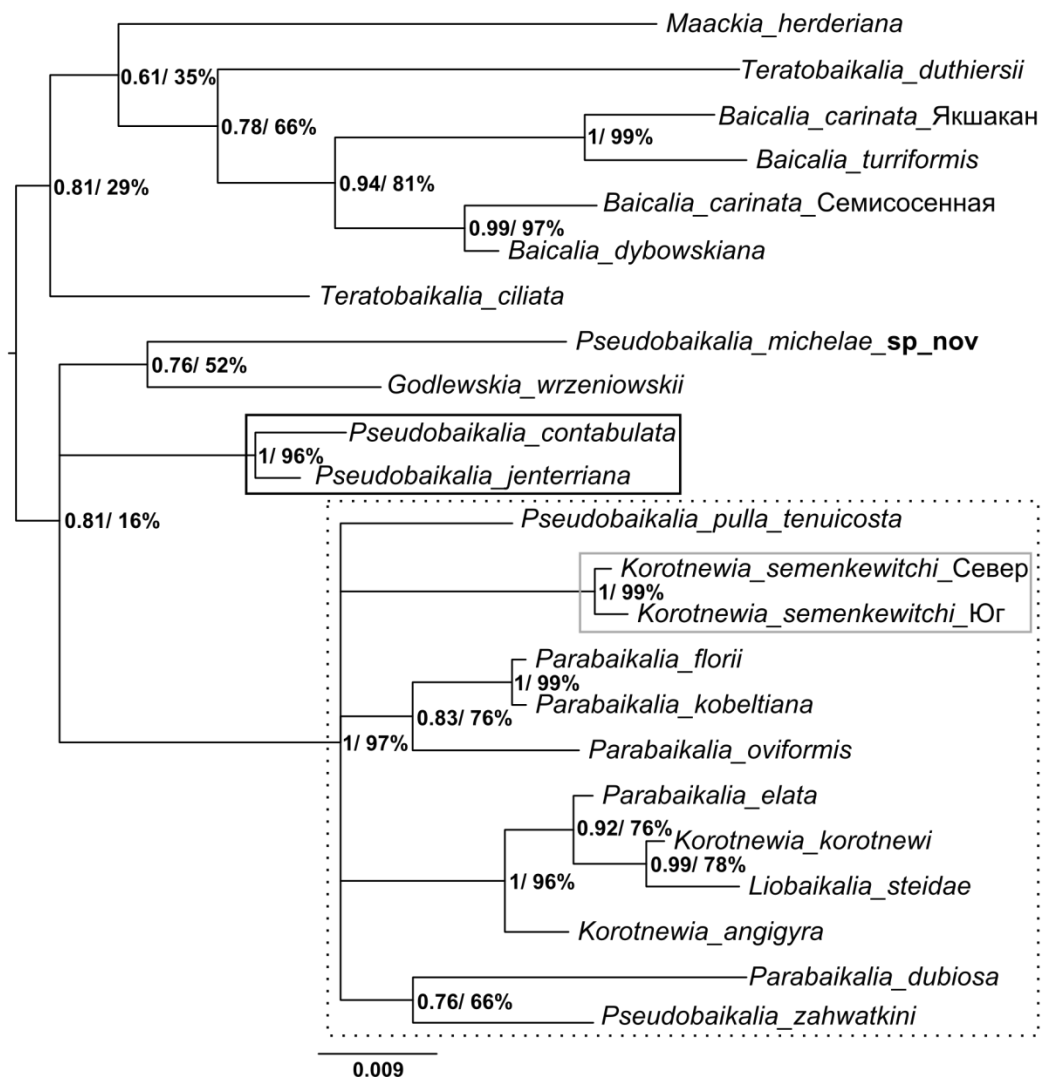


Рис.27. Филогенетическое древо байкалийн, построенное на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохром с-оксидазы. Узлы со значениями апостериорных вероятностей менее 0.5 схлопнуты в политомии. Первое значение в узлах представляет значения апостериорных вероятностей, второе – бутстреп-поддержки ML-древа.



Таким образом, только 7 видов входят в эту кладу по обоим маркерам. Необходимо отметить, что генетически близкими оказались виды со сходными биотопами – все исследованные виды родов *Korotnewia*, *Parabaikalia* и *Pseudobaikalia* – зарываются в песок. Кроме того, почти все эти виды обладают сходными морфологическими признаками: широкий апикальный угол и преимущественно гладкая поверхность раковины или наличие на поверхности коротких периострокальных волосков (Ситникова, 2004).

Интересным на всех полученных деревьях выглядит положение вида *Liobaikalia steidae*, который отличается от других видов разомкнутыми ветками. По нуклеотидным последовательностям различных маркеров этот вид очень близок к разным видам байкалийн: на митохондриальном древе он кластеризуется с видами родов *Korotnewia* и *Parabaikalia*, а при использовании последовательностей интрона  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы – с видами рода *Pseudobaikalia* и *Teratobaikalia ciliata*. При этом, несмотря на крайне небольшое количество нуклеотидных замен, два из трех проанализированных интронов этого вида, в отличие от большинства других видов байкалийн, содержат крупные делеции от 70 до 300 п.н.

Отдельный интерес представляет пара сестринских и морфологически сходных видов *Pseudobaikalia contabulata* и *P. jenterriana*: на митохондриальном древе они формируют общую кладу (генетическая дистанция 0.9% замен), при этом дистанция между этими видами по последовательностям интрона составляет 2.2%, а *P. contabulata* входит в кладу псаммофильных видов.

Для разрешения «сложных случаев», когда результаты, полученные с помощью разных маркеров, сильно противоречат друг другу, необходимо использование дополнительных маркеров. По последовательностям фрагмента интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы (длиной 400 п.н.) три вида (*P. contabulata*, *P. jenterriana*, *P. zachwatkini*) отличаются на 2-3%.

В качестве дополнительного ядерного маркера можно использовать последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS-1). В ходе исследования были получены нуклеотидные последовательности ITS-1 для 12 видов байкалийн. Длина маркера варьирует от 264 до 319 п.н.

Последовательности межгенного спейсера содержат очень большое количество перекрывающихся вставок и делеций, но при этом относительно мало нуклеотидных замен (Рис. 28). После удаления всех инделов и неоднозначно выравниваемых сайтов медианное значение генетического полиморфизма составляет  $3.8 \pm 1.7\%$  замен. Последовательности ITS-1 *P. jenterriana* и *P. zachwatkini* отличаются друг от друга только одной нуклеотидной заменой. Кроме того, эти виды имеют очень сходные инделы. Последовательности ITS-1 *P. contabulata* очень сходны между собой, но достаточно сильно отличаются от *P. jenterriana* и *P. zachwatkini* (как и по интронному маркеру). Таким образом, вид, обитающий только в Северной котловине озера, *P. jenterriana* по трем маркерам имеет очень маленькие генетические дистанции с двумя другими видами: по митохондриальному фрагменту — с *P. contabulata*, по ядерным — с *P. zachwatkini*.

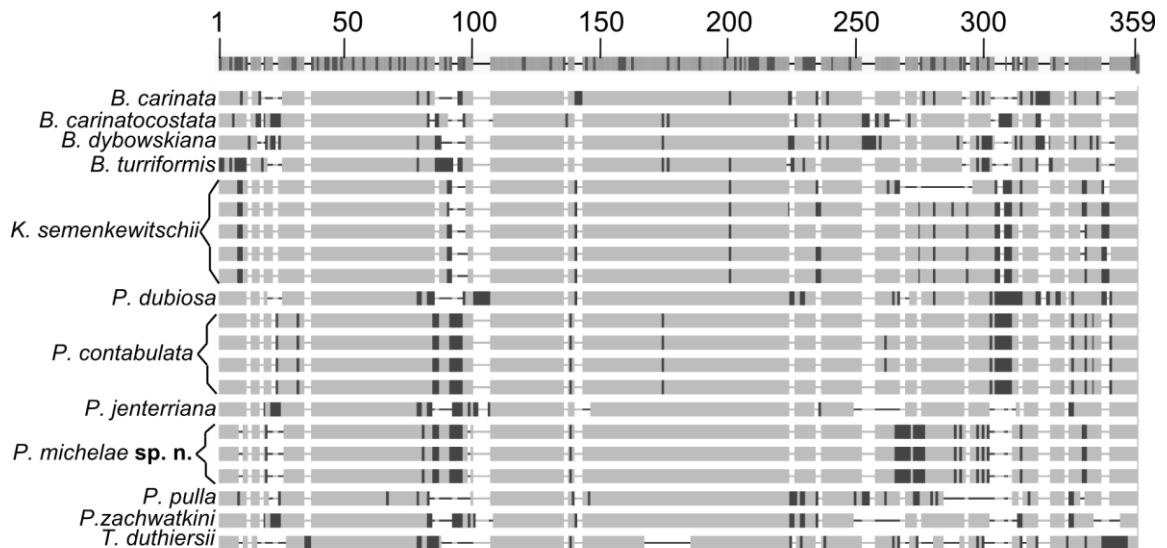


Рис. 28. Структура ядерного межгенного спейсера ITS-1 двенадцати видов байкалийн. Серым цветом отмечены консервативные участки, черным — нуклеотидные замены и вставки.

Внутривидовые дистанции по последовательностям интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы для представителей разных видов из географически удаленных регионов и *P. michelae* из одной станции сбора составляют менее 1% нуклеотидных замен, исключение составляет *K. semenkewitschi* (Рис. 29).

Использование интронного маркера позволяет предполагать интрогрессию ядерного генома у моллюсков *K. semenkewitschi*. Внутривидовые дистанции между последовательностями интрона превышают средние межвидовые ( $1.81\% \pm 0.69$ ), хотя внутривидовая изменчивость фрагмента мтДНК и межгенного спейсера у этого вида почти отсутствует (Рис. 34). Среднее значение внутривидовых дистанций между последовательностями интронного маркера после исключения *K. semenkewitschi* составляет  $0.31 \pm 0.30$  (Рис. 30).

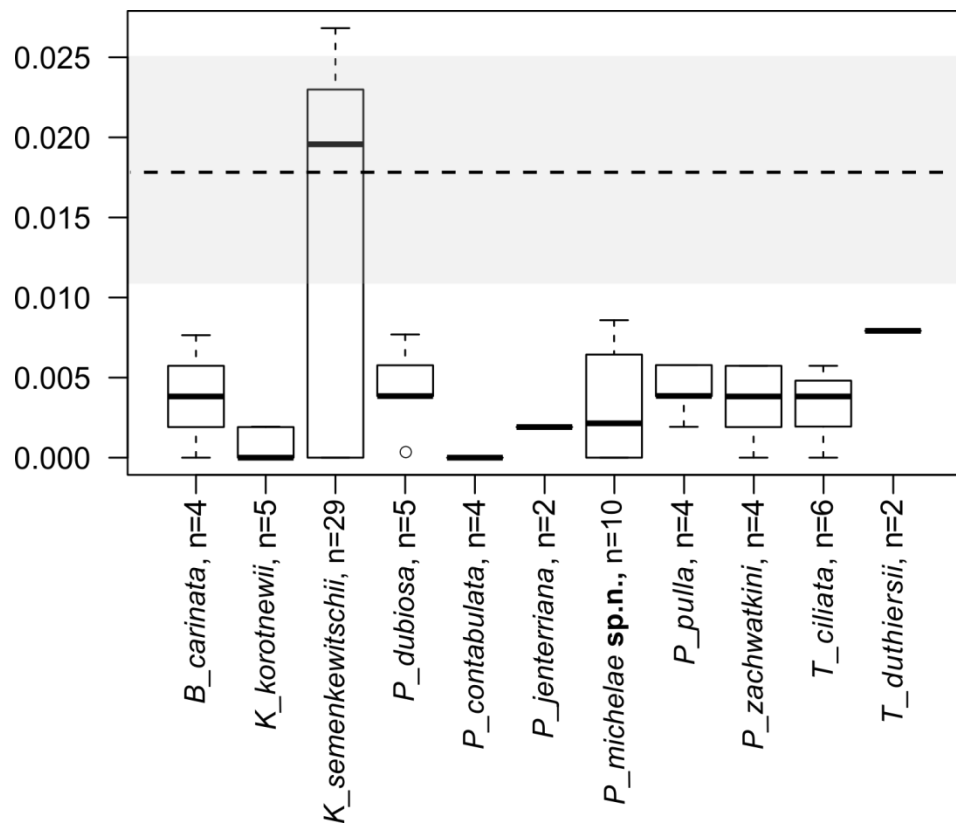


Рис. 29. Генетические дистанции моллюсков между последовательностями интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы. Пунктиром показано среднее значение межвидовых дистанций для представителей подсем. Baicaliinae; серым цветом — ско. Указано количество проанализированных особей (n).

Несоответствия в составе основных кластеров деревьев, построенных по трем разным маркерам, могут быть объяснены переносом ядерных генов и их рекомбинацией на раннем этапе формирования букета видов.

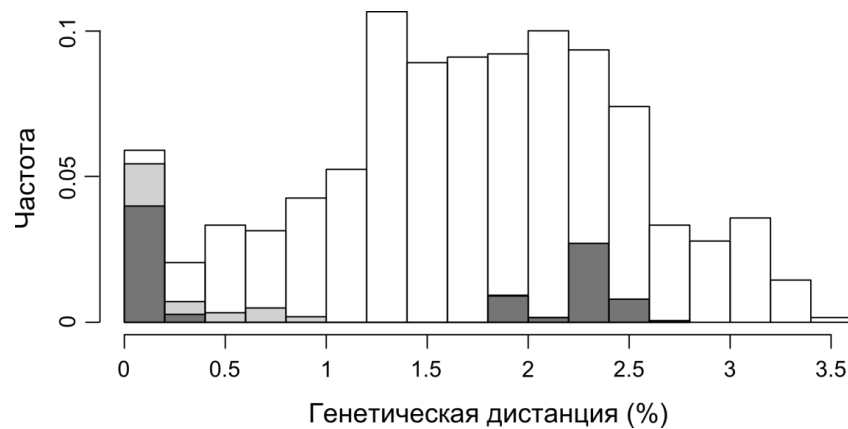


Рис. 30. Гистограмма межвидовых (белый цвет) и внутривидовых (светло-серый) попарных генетических дистанций аллелей интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков. Темно-серым— показаны дистанции внутри вида *K. semenkewitschi*.

### Объединение генетических, морфологических и экологических признаков моллюсков подсем. *Baicaliinae*

Объединение и байесовский анализ генетических, морфологических и экологических характеристик видов может в значительной мере способствовать получению наиболее полной информации о филогении видов (Farias, 2000; Polotow, 2015).

Двадцать два морфологических и экологических признака, нуклеотидные последовательности фрагмента гена цитохром с-оксидазы и интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы, а также бинарная информация об инделах интрона были объединены для построения филогенетического дерева девятнадцати видов байкалийн (Приложение. Таблица 4). *P. jenterriana* и аллели интрона характерные для южных популяций *K. semenkewitschi* не использовались в ходе данного анализа, поскольку противоречия, существующие между фрагментами с разной клеточной локализацией, на наш взгляд, могут являться следствием межвидовой гибридизации, которая

не может быть показана на филогенетическом древе. В результате объединения всех данных получено дихотомическое древо (Рис. 31).

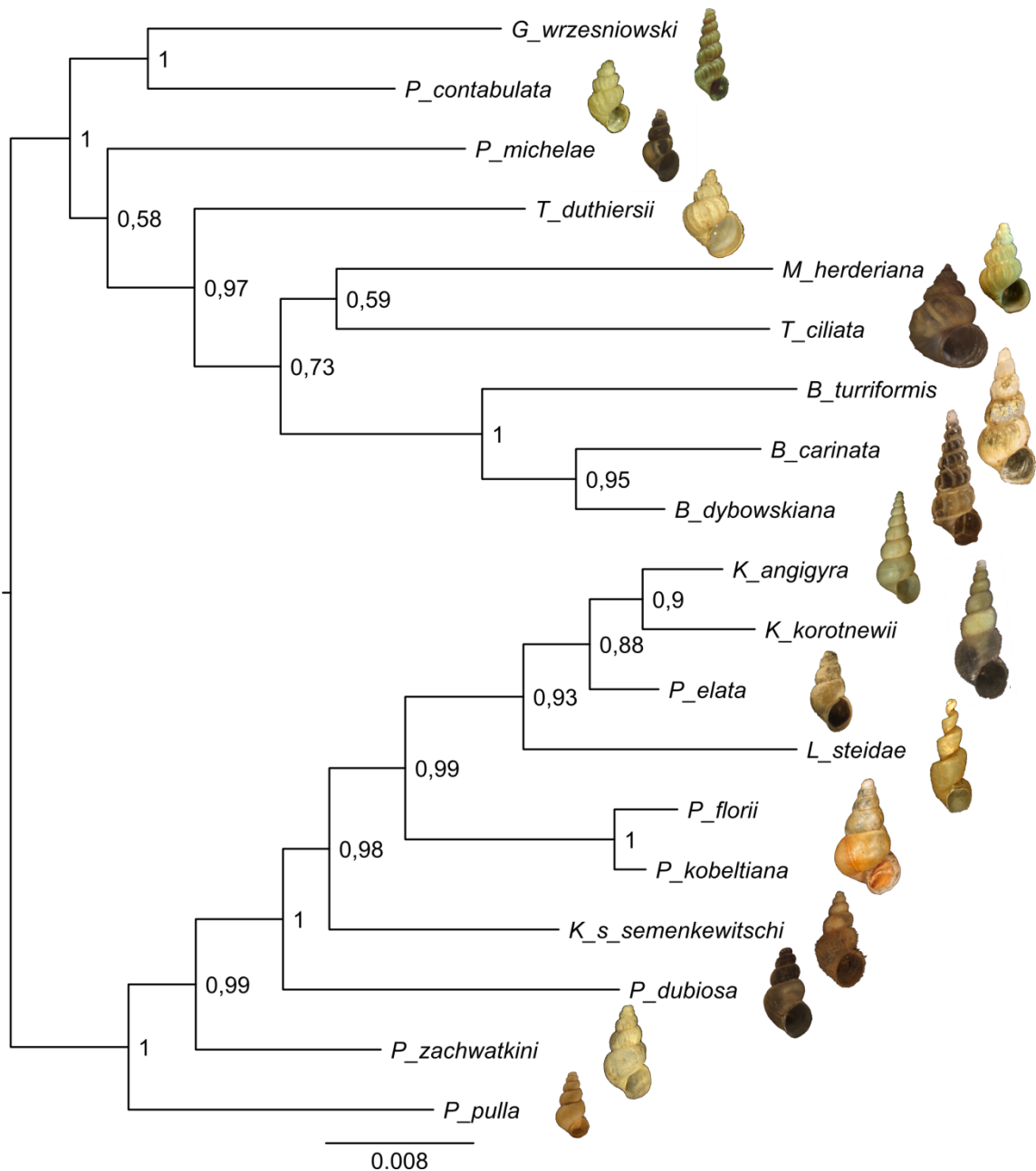


Рис. 31. Байесовское древо девятнадцати видов байкалийн, построенное на основании объединения морфологических и генетических признаков.

Девятнадцать видов делятся на две группы. В первую группу, состав которой совпадает с составом псаммофильной клады на митохондриальном древе, входят виды, которые внешне очень сходны: раковины преимущественно ширококонические с округлыми или уплощенными оборотами, гладкие или с небольшими периостракальными волосками. Во

вторую группу входят преимущественно литофильные или мигрирующие на камни в период размножения виды. При этом все, кроме *P. michelae* sp. n. имеют ярко выраженную скульптуру: ребра или валики. В отличие от деревьев, полученных с использованием отдельных генетических маркеров, псаммофильная клада полностью разрешена.

### Филогеография *Korotnewia semenkewitschi* в Байкале

Два подвида гастропод *Korotnewia semenkewitschi* имеют географическую структуру, схожую с таковыми у других пар подвидов и видов этого же семейства: псаммофилов *P. pulla pulla* и *P. pulla tenuicosta* и литофилов *M. herderiana* и *M. variesculpta*. Этот факт позволяет предполагать, что внутривидовая структура согласуется с делением на зоогеографические провинции в соответствии с предложением М.М. Кожова: южная— от Ольхонских ворот до дельты р. Селенги, северная— от Малого моря до Баргузинского залива.

Проведен морфометрический анализ тридцати шести особей *K. semenkewitschi* из двенадцати станций сбора, расположенных в литоральной зоне озера по тринадцати линейным характеристикам телеоконха и пигментации тела (Приложение. Таблица 5, Приложение. Таблица 6).

При этом все размерные характеристики за исключением количества оборотов имеют достоверно высокие корреляции (среднее значение коэффициентов корреляции 0.71) (Приложение. Рис. 1).

Результаты многофакторного анализа отражают единство проанализированных моллюсков в пространстве координат 1-й и 2-й главных компонент, которые объясняют 87.2% изменчивости признакового пространства. Вклад каждой размерной характеристики в формирование компоненты 1 варьирует от -0.22 до -0.35. Наибольшим абсолютным значением нагрузки на главную компоненту 1 характеризуются общая высота завитка (-0,35), высота предпоследнего оборота (-0,33) и длина боковой

линии предпоследнего оборота (-0,33). Таким образом, главную компоненту 1 можно интерпретировать как размерную характеристику раковин, значительное влияние на которую будет оказывать возраст моллюска. Наибольший вклад в формирование второй компоненты, объясняющей 11,2% изменчивости пространства признаков, вносят линейные размеры устья (от 0,29 до 0,39) при этом организмы из разных станций сбора кластеризуются совместно. Главная компонента 3 описывает 9,1 % варибельности признакового пространства. Наибольший вклад вносят количество оборотов (0,78), крутизна оборотов (-0.46), и высота завитка (0.28). Именно по количеству оборотов и зависящей от него высоте завитка моллюски, сгруппированные по зоогеографической провинции, отличаются достоверно. Однако границы между провинциями не четкие, почти половина моллюсков, собранных в разных котловинах и имеющих меньшие размеры (до 7 мм в высоту и 4 мм в ширину), группируются совместно, что может быть связано с относительной молодостью проанализированных особей (Рис. 32).

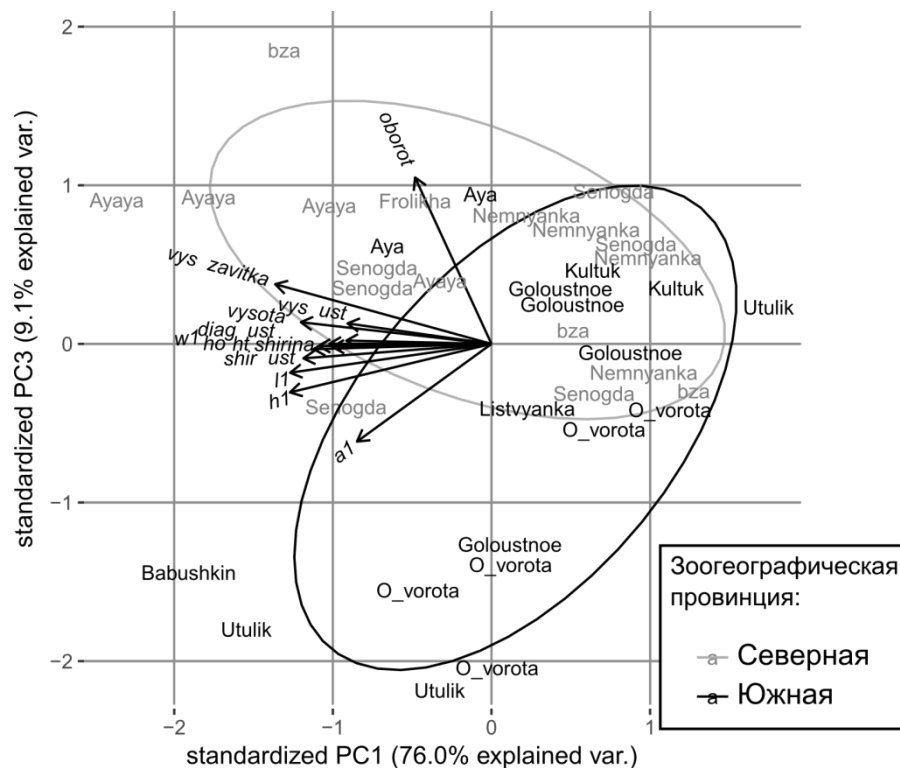


Рис. 32. Распределение исследованных моллюсков *K. semenkewitschi* в пространстве первой и третьей главных компонент по данным геометрической морфометрии. Курсивом показаны морфологические признаки в соответствии с обозначениями, показанными на рисунке 5.

Можно отметить, что более крупные моллюски из южной провинции имеют меньшее количество оборотов и высоту завитка из-за того, что первые 1-2 оборота оказываются обломлены. Кроме того, вне зависимости от размерных характеристик моллюски, собранные в южной зоогеографической провинции чаще имеют темную пигментацию тела (15 из 18 организмов), а в северной котловине цвет тела всегда светлый.

Для проведения кластерного анализа для всех пар особей были рассчитаны расстояния Махаланобиса по морфологическим признакам. Только для диагонали устья и высоты первого оборота может быть отвергнута гипотеза нормального распределения, поэтому для всех признаков, кроме этих, матрица корреляций рассчитывается по методу Пирсона.

Кластерный анализ позволяет различить 3 группы: (1) крупные моллюски Южной провинции и 2 некрупные особи из бухты Сеногда, (2) крупные моллюски из Северной провинции и большинство некрупных моллюсков, а также (3) смешанная клада из 7 крупных особей из всех трех котловин (Рис. 33).

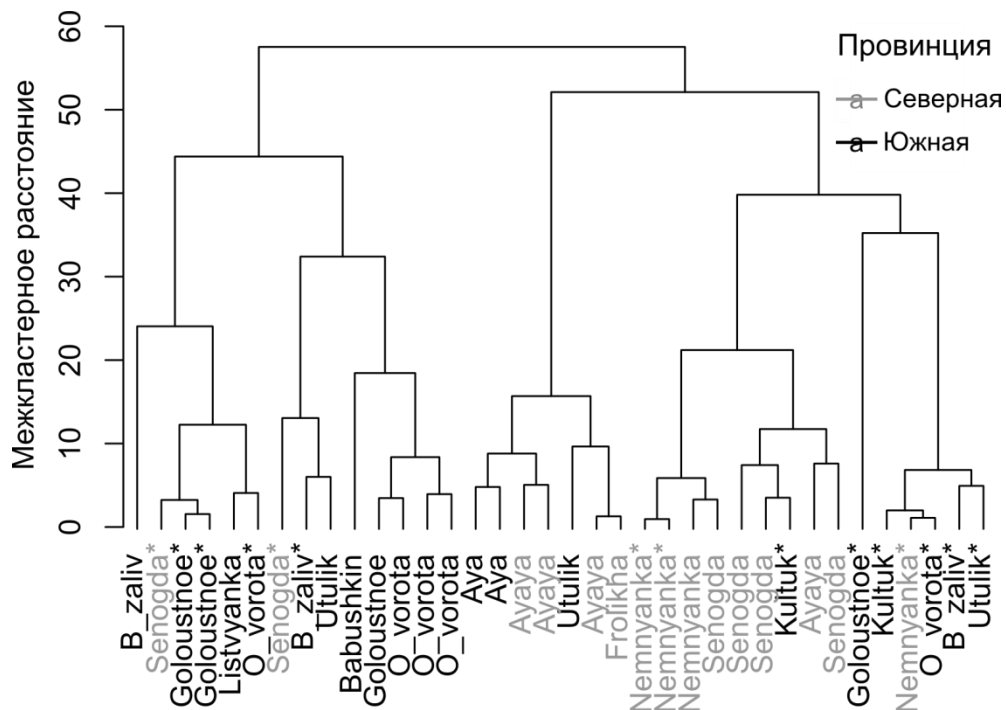


Рис. 33. Кластерный анализ *K. semenkewitschi*. Моллюски, высота раковины которых не превышает 7 мм, а ширина — 4 мм, отмечены звездочкой.



Сходство особей из разных частей ареала, по всей вероятности, может быть связано с мозаичностью условий среды. Необходимо отметить, что собранные, в разных котловинах моллюски несколько отличаются по глубинам обитания. Таким образом, наблюдаемые отличия высоты раковин и цвета тела могут быть обусловлены отличиями занимаемых ниш вдоль периметра озера, например, волновым воздействием и освещенностью. Для других представителей подсемейства известно, что отсутствие темной пигментации тела часто связано с обитанием на больших глубинах, в толще песка или предпочтением подовой стороны камней (Ситникова, 2004).

Чтобы понять какие из признаков в большей степени связаны с морфологической изменчивостью, был проведен однофакторный дисперсионный анализ с учетом пяти факторов: цвет тела, зоогеографическая провинция, котловина сбора, минимальная глубина сбора, генотип интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы. И наиболее отличающихся морфологических признаков: высота завитка и количество оборотов.

Многие факторы взаимосвязаны, но наибольшее влияние на количество оборотов оказывает зоогеографическая провинция, цвет тела и котловина озера, хотя минимальная глубина обитания также имеет достоверное влияние (Таблица 2).

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена CO1 и ITS-1 позволил выявить 3 и 4 гаплотипа, отличающихся на 1-2 нуклеотидные замены без четких географических паттернов у 10 представителей *K. semenkewitschi* из разных географических районов (дистанции по последовательностям CO1 составляет менее 0.2% замен), в то время как генетические дистанции между аллелями интронного маркера сопоставимы с межвидовыми (1.9% замен). Пять гаплотипов интрона, обнаруженные у двадцати девяти особей, по-разному располагаются на филогенетическом древе байкалийн. Гаплотипы, преобладающие вдоль западного побережья и в Южной котловине, не входят в псаммофильную кладу, в то время как положение гаплотипов широко распространенных по всему ареалу, и,

вероятно, принадлежащих *K. semenkewitschi semenkewitschi*, в большей степени согласуется с положением этого вида на древе, построенном по фолмеровскому фрагменту (Рис. 34).

Таблица 2. Зависимость морфологических признаков (количество оборотов и высоты завитка) от экологических и генетических характеристик. Значения однофакторного дисперсионного анализа (F). В скобках указаны значения p-value. \* – 0.5-0.1; \*\* – 0.1-0.01; \*\*\* – <0.001.

Признак	Количество оборотов	Высота завитка
Минимальная глубина	5.48 (0.025) *	2.26 (0.142)
Средняя глубина	0.311 (0.581)	0.165 (0.687)
Зоогеографическая провинция	24.3 (2.12e-05) ***	5.396 (0.026) *
Котловина	11.63 (0.00015) ***	3.376 (0.046) *
Цвет тела	20.29 (7.47e-05) ***	2.382 (0.132)
Генотип интрона	1.845 (0.159)	1.169 (0.337)

При этом наиболее генетически близким гаплотипом для «аллелей *K. semenkewitschi semenkewitschi*» являются последовательности интрона *P. kobeltiana*. А «аллели *K. semenkewitschi nitida*» отличаются только на 1-2 нуклеотидные замены от аллеля, занимающего центральное положение на древе байкалийн и обнаруженного у трех видов (р. *Pseudobaikalia* и *Teratobaikalia*).

Наблюдаемые различия в генетических дистанциях по разным маркерам для сестринских видов и подвидов одного вида могут быть следствием сохранения предкового полиморфизма интронным маркером и снижения разнообразия митохондриального генома, например, в результате действия отбора, или интрогрессии митохондриального или ядерного генома в результате гибридизации. Наличие семи гетерозиготных образцов, собранных вдоль западного побережья озера от п. Листвянка на юге до г. Богучанской на севере, а также совместное обитание носителей разных

аллелей ок. п. Утулик, свидетельствует об отсутствии репродуктивного барьера между разными формами *K. semenkewitchii*. Поскольку в б. Сеногда у *K. semenkewitchii* преобладают аллели интрона, которые чаще встречаются у моллюсков восточного побережья озера, возможно отнести этих животных к популяции, включающей экземпляры из Баргузинского залива и м. Немнянка. При таком разделении на две популяции только 28.4% полиморфизма интрона объясняется популяционной структурой.

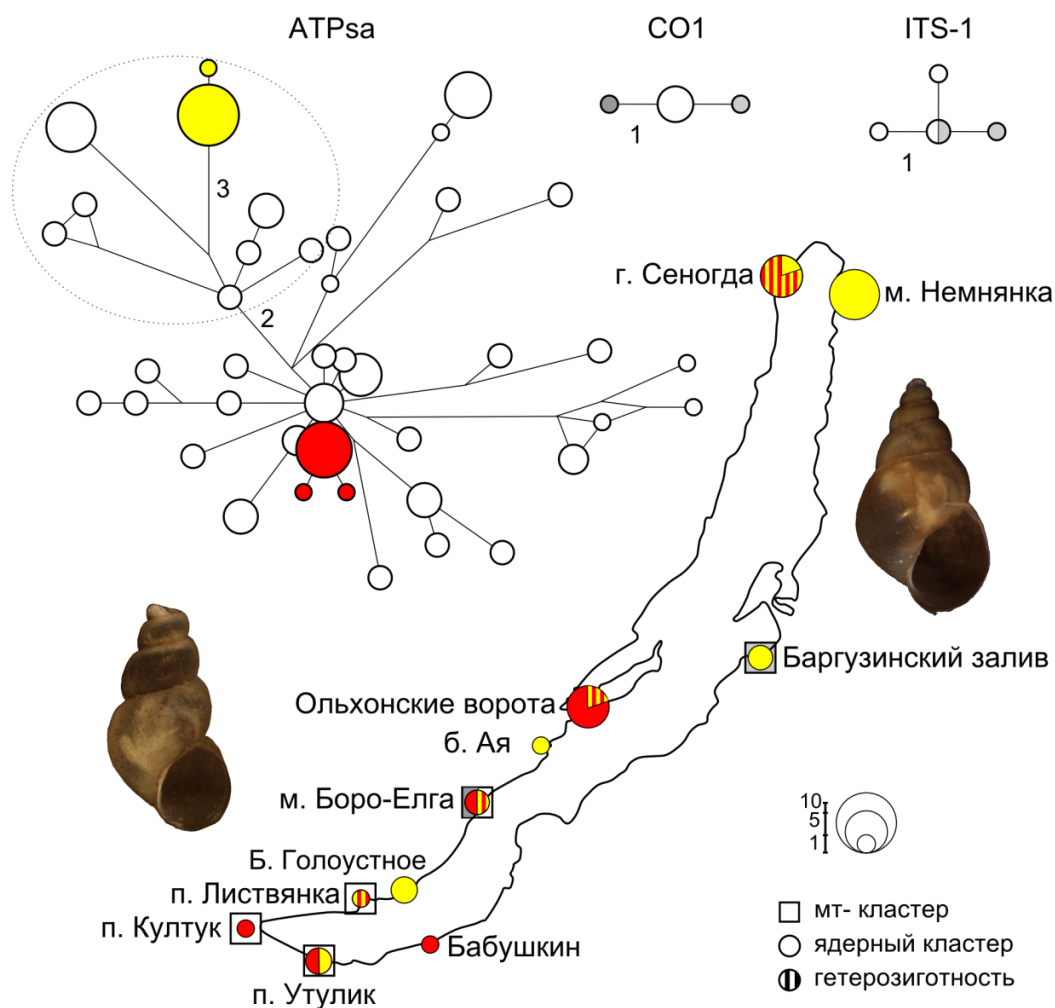


Рис. 34. Внутривидовая изменчивость *K. semenkewitchii* по последовательностям интронного, митохондриального и межгенного маркеров. Размер кружков отражает частоту встречаемости аллелей (деревья) и размер выборки (карта). Цифрами обозначено количество отличающихся нуклеотидов между аллелями.

Мозаичность распределения аллелей разных клад в Южной котловине озера может быть следствием генетического дрейфа в локальных

популяциях, поскольку моллюски малоподвижны и имеют «пятнистое» распределение в озере.

Наблюдаемая картина полиморфизма может быть сходна с выявленной ранее внутривидовой генетической изменчивостью митохондриального маркера CO1 у широко распространенного псаммофильного вида *B. carinata*, у которого существует две популяции с границами на севере и юго-востоке озера (около дельты р. Селенга) (Перетолчина и др., 2007). У амфипод *G. fasciatus* подобная популяционная структура была выявлена при использовании интронного маркера (см. глава 3.3.1).

В качестве вероятных причин формирования наблюдаемого генетического разнообразия можно назвать рефугиальное происхождение двух популяций, при этом в одной из популяций могла произойти гибридизация с каким-либо близкородственным видом и интрогрессия фрагмента ядерного генома. При последующем расселении дрейф мог привести к закреплению различных аллелей в разделенных популяциях.

#### **Таксономический статус *P. michelae* sp. n.**

В ходе исследования моллюсков подсемейства Baicaliinae в южной части озера (около п. Култук, п. Утулик и на Муринской банке), а также в Баргузинском заливе были обнаружены особи, имеющие достаточно сильно отличающиеся последовательности как митохондриального, так и ядерного маркеров (интрон гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы). Минимальные дистанции по последовательностям интрона – 1.2% с *P. jenterriana*, и 4.1% нуклеотидных замен – по последовательностям фрагмента гена цитохром с-оксидазы с *Godlewskia wrzesniowski*, что сопоставимо с межвидовыми дистанциями в пределах подсемейства.

Детальное морфологическое изучение подтвердило, что обнаруженные экземпляры относятся к виду, который не был описан ранее (Рис. 35).

На основании ряда конхиологических признаков и строения женской половой системы новый вид был отнесен к роду *Pseudobaikalia* и назван *P. michelae* в честь исследователя малакофауны древних озер Эллинор Мичел из Лондонского музея естествознания (Ellinor Michel, Natural History Museum, London). На данный момент род *Pseudobaikalia* содержит 7 преимущественно мелководных видов, встречающихся на глубинах до 100 м (обычно 3-50 м).

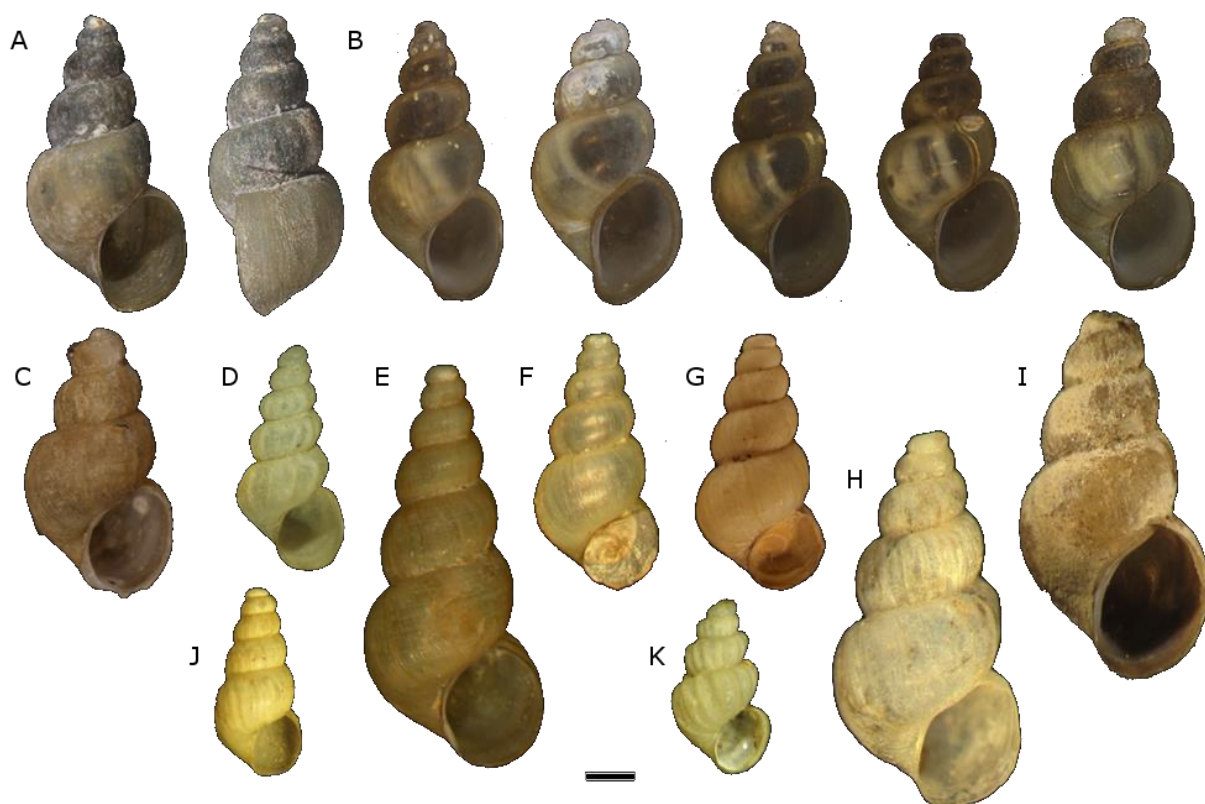


Рис. 35. Раковины типовых образцов *Pseudobaikalia michelae* sp. n. и синтипы других видов рода *Pseudobaikalia* из коллекции ЗИН. А. Голотип *P. michelae* sp. n. В. Паратипы *P. michelae* sp. n., использованные в анализе. С. *P. michelae* sp. n. (= *Leucosia angarensis* var. *pulla*, один из синтипов, определенных Дыбовским); D. *P. elegantula* (No. 2); E. *P. jentteriana* (No. 1); F. *P. pulla pulla* (No. 1); G. *P. p. tenuicosta* (No.1); H. *P. zachwatkini* (No. 1); I *P. elata* (= *B. angarensis elata*, No.1); J. *P. cancellata* (No. 1); K. *P. contabulata* (No. 1). Шкала 1 мм.

По размеру и скульптуре раковины *P. michelae* sp. n. более всего похож на *P. jentteriana*, обитающий только в Северной котловине Байкала, но отличается по цвету раковины и тела, а также по строению женской половой системы.

Образцы были собраны преимущественно на мягких, песчано-илистых грунтах (с примесью камней только около п. Култук) вместе с некоторыми другими типичными псаммофилами: *Godlewskia pulchella* (Dybowski, 1875) и *Korotnewia semenkewitschi*. Кроме того, в трех из четырех станциях сбора моллюски были собраны совместно с представителями трех других видов рода *Pseudobaikalia*: *P. contabulata*, *P. pulla* и *P. zachwatkini*. Симпатрия близкородственных видов моллюсков подсем. Baicaliinae отмечается достаточно часто, однако в данном случае возможно расхождение видов по «микронишам» (Ситникова, 2004).

### Филогенетическое исследование полихет рода *Manayunkia*

Определены нуклеотидные последовательности интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы 28 особей, принадлежащих трем видам байкальских полихет рода *Manayunkia* (Рис. 36), а также двух полихет из озера Баунт, и двух – из озера Глухое в бассейне р. Колымы (Приложение. Таблица 7).

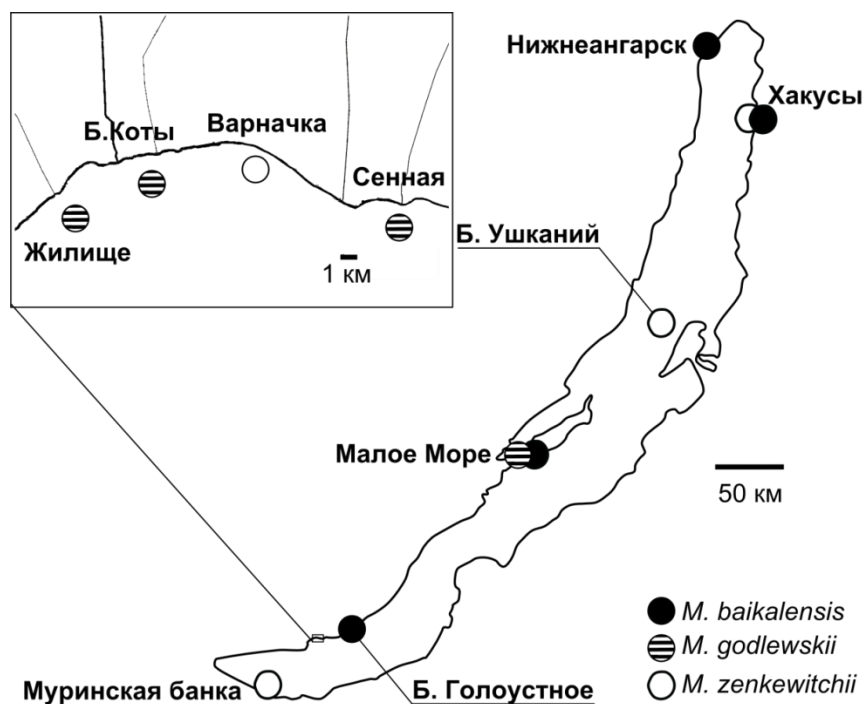


Рис. 36. Карта-схема мест сбора байкальских полихет. Станции сбора отмечены кружками.

Длина интрона сибирских манаюнок варьирует от 185 до 211 п.н. У полихет с Дальнего Востока длина интрона составила 444 п.н. Сходство нуклеотидных последовательностей интронов сибирских и дальневосточных полихет оказалась невелика, и ограничивается регионами вблизи границ экзонов: длиной около 90 п.н. у 5'-конца интрона и 60 п.н. у 3'-конца. Даже для этих относительно консервативных регионов вероятен эффект насыщения заменами. Сходство приконцевых фрагментов интрона полихет с Дальнего Востока и сибирских составило только  $72.91 \pm 5.37\%$  (при АТ-содержании 56%), что не позволяет использовать последовательности интрона дальневосточных полихет в качестве аут-группы в филогенетических построениях. В регионе, уникальном для дальневосточных полихет со 105 по 306 п.н., присутствует АТ-богатая последовательность, содержащая прямой парный повтор с длиной мономера 85 п.н., сходство между мономерами повтора около 93%. При этом вся вставка, присутствующая у небайкальских полихет, имеет содержание АТ-нуклеотидов более 76%.

В четырех аллелях байкальских полихет также присутствует тандемный повтор 18 п.н. у единичных представителей *M. zenkewitchii* и *M. godlewskii*, где вставка дублирует следующий сегмент длиной 23 п.н (Рис. 37).

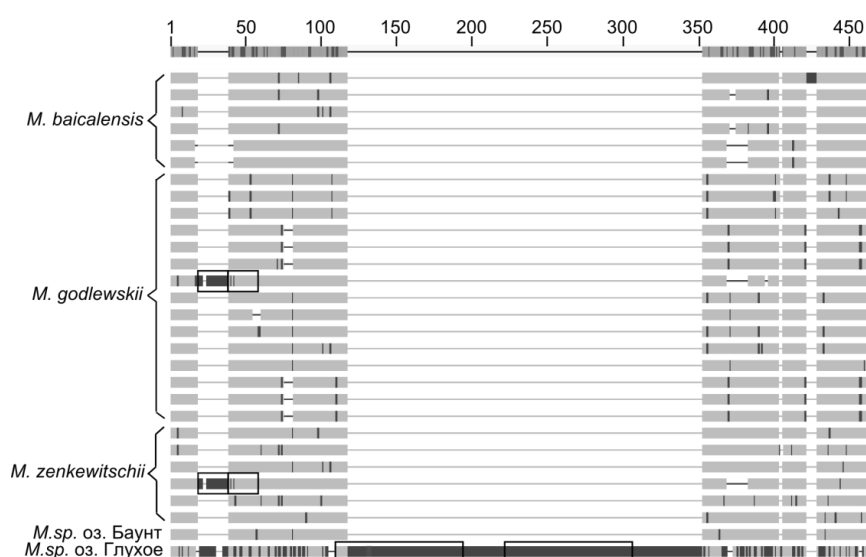


Рис. 37. Структура интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы полихет. Серый – консервативные участки, черный – несовпадающие сайты: нуклеотидные замены и вставки. Рамками отмечены мономеры повторов.

Для 22 образцов также были определены фрагменты экзонов, фланкирующих интрон (30 и 19 п.н. после исключения праймерной области). В полученном экзонном фрагменте содержатся 3 синонимичные нуклеотидные замены и все они расположены в третьем положении кодона. Три из проанализированных организмов оказались гетерозиготны хотя бы по одному из этих вариабельных сайтов.

В двух случаях изолейцин (I) кодируется кодонами АТТ и АТС, а одна из аминокислот аланина (А) – GCT и GCC (Рис. 38).

\*                     ▼                     \*             \*

**E L I I G D R Q T G K T A V A I D T I I N**

Рис. 38. Аминокислотная последовательность экзонов, фланкирующих интрон гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы полихет. Стрелкой показано положение интрона, звездочками аминокислоты, кодоны которых содержат нуклеотидные замены.

По данным транскриптомов трех видов полихет *Branhipolynoe pettiboneae*, *Lepidonotpodium sp.* и *Harmothoe imbricata* известно, что кодоны аланина и изолейцина, оканчивающиеся цитозином встречаются приблизительно на 20-40% чаще, чем кодоны этих аминокислот, оканчивающиеся тиминном (Zhang et al., 2017).

Ни одна из замен, расположенных в экзонах, не является видоспецифичной для байкальских полихет. Однако АТС-вариант первого экзона встречается преимущественно у *M. baicalensis* и *M. zenkewitschii* (90% аллелей этих видов), у дальневосточных полихет, и только у одной из тринадцати особей *M. godlewskii*, а АТС и GCC варианты кодонов во втором экзоне — только у *M. zenkewitschii* и *M. godlewskii*.

Значительная часть особей *M. godlewskii* из озера Байкал оказались гетерозиготами по последовательности интрона (58%), хотя только половина из них из двух точек сбора (Малое Море и падь Жилище) обладали аллелями, отличающимися на 2 и более нуклеотидных замен (Рис. 39).



Для определения аллелей интрона дважды была проведена реконструкция аллелей с помощью алгоритма PHASE, что позволило получить 27 уникальных аллелей.

Вариабельность интрона полихет достаточно высока и может достигать 10% нуклеотидных замен, однако средние значения генетических дистанций для ядерного и митохондриального маркеров отличаются приблизительно в 3 раза.

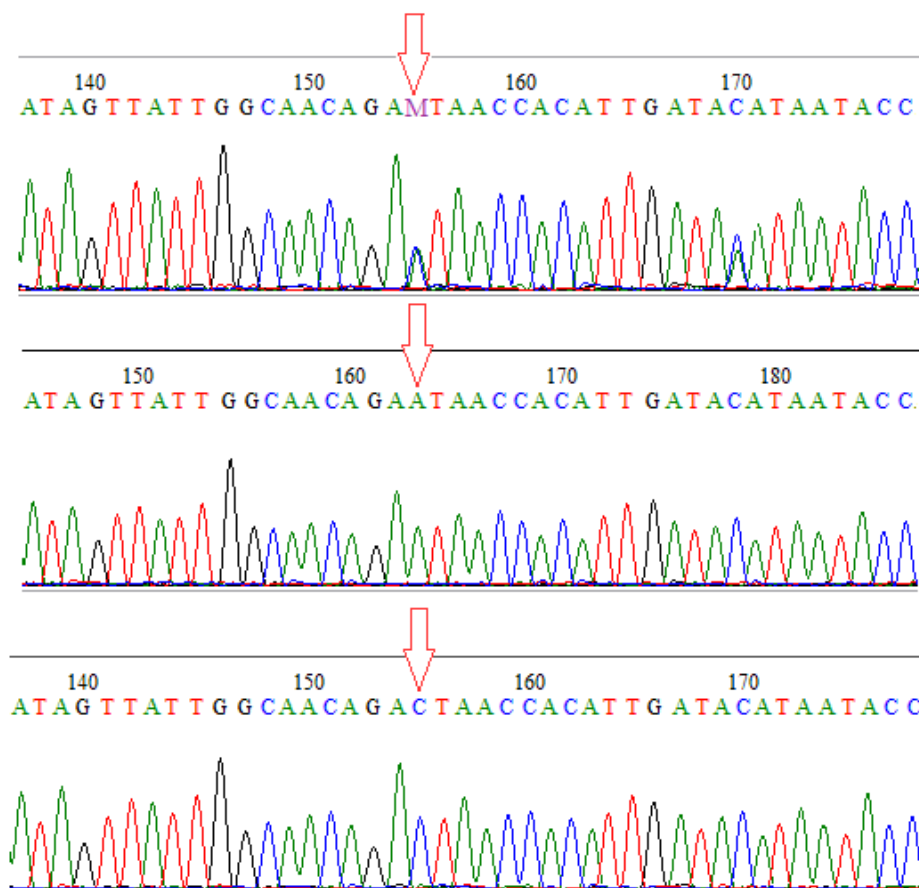


Рис. 39. Полиморфизм и гетерозиготность последовательностей интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы полихет *M. godlewskii*. Стрелки указывают полиморфный сайт.

Медианные значения внутри- и межвидовых генетических дистанций полихет отличаются лишь незначительно и почти полностью перекрываются:  $3.16 \pm 1.90\%$  и  $4.02 \pm 1.74\%$  соответственно (Рис. 40).

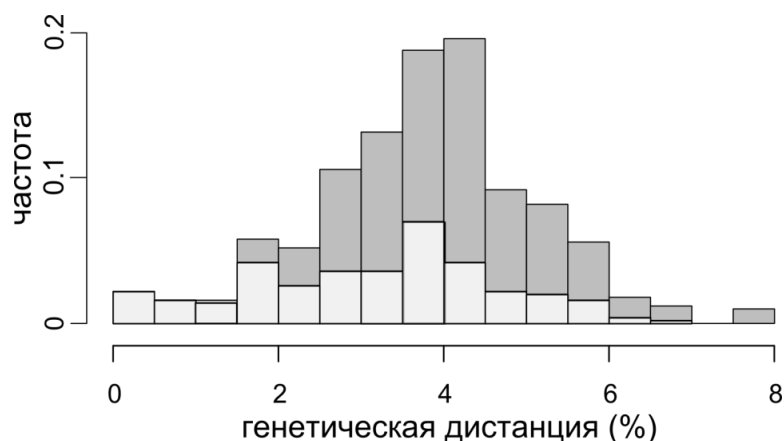


Рис. 40. Перекрывающиеся распределения попарных внутривидовых (светло-серый) и межвидовых (серый цвет) генетических дистанций между последовательностями интрона полихет.

Наибольшие медианные генетические дистанции по последовательностям обоих маркеров у *M. zenkewitschii*, а наименьшие по последовательностям интрона – у *M. baicalensis* (Рис. 41).

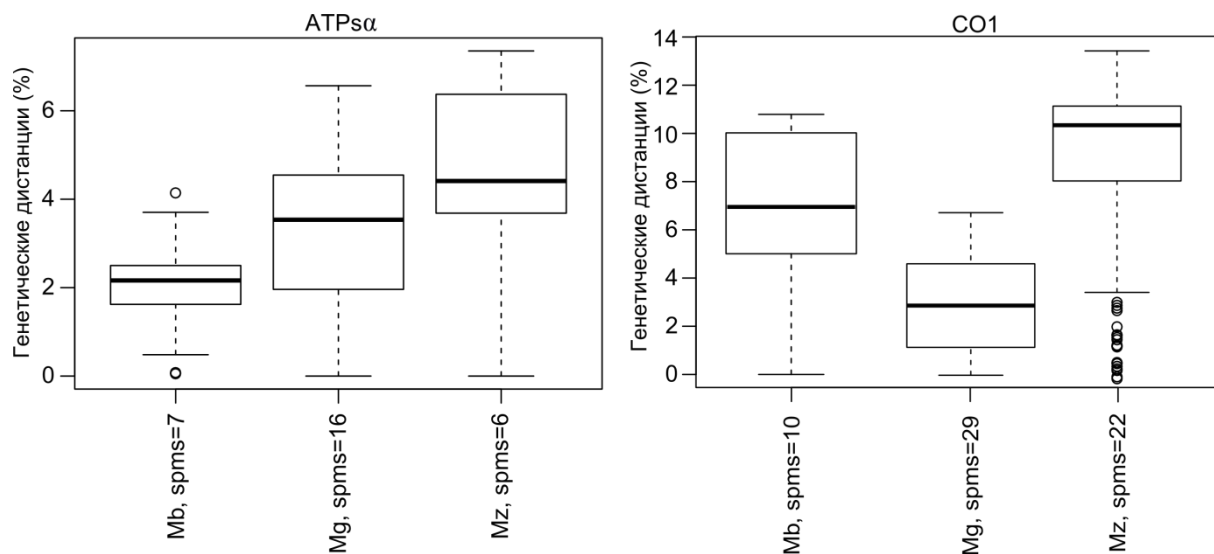


Рис. 41. Внутривидовые генетические дистанции для аллелей трех видов байкальских полихет: Mb- *M. baicalensis*, Mg- *M. godlewskii*; Mz- *M. zenkewitschii*; также указано количество проанализированных особей (spms).

Наиболее правдоподобные модели нуклеотидных замен для построения филогенетических деревьев выбраны с использованием байесовского критерия: НКУ+G для интрона, К80+I для экзонных фрагментов и НКУ+I+G для CO1. Топологии деревьев, полученных на основе нуклеотидных

последовательностей интрона и митохондриального маркера, сильно отличаются (Рис. 42).

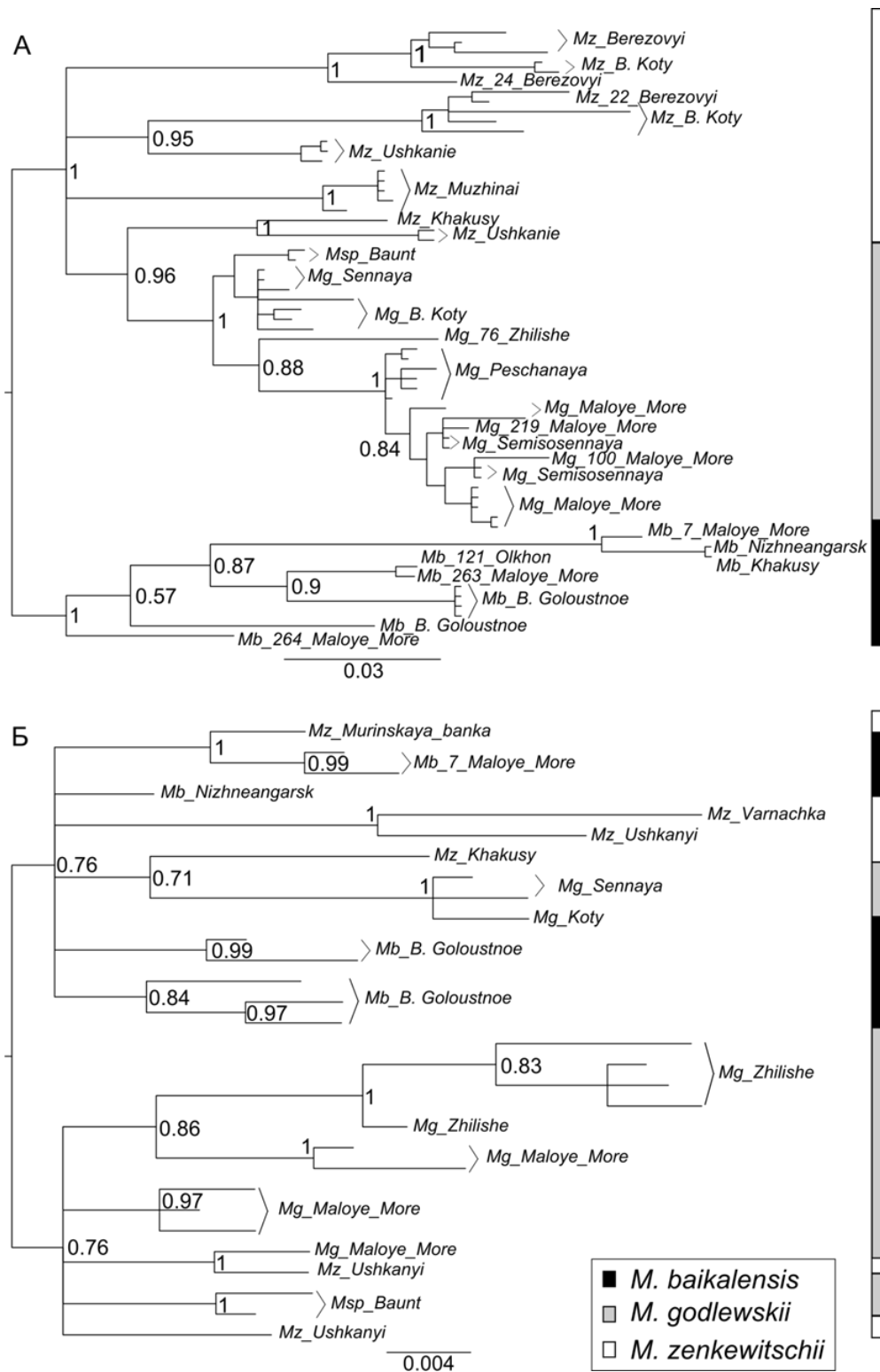


Рис. 42. Филогенетические деревья полихет рода *Manayunkia*: А- по фрагменту гена CO1; Б- по интрону гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы. В узлах показаны значения апостериорных вероятностей (значения менее 0.5 не показаны). Цвета вертикальной линии отражают видовую принадлежность.

На митохондриальном древе все представители *M. baicalensis* и *M. godlewskii* формируют отдельные хорошо поддержанные клады (апостериорные вероятности = 1.00). В отличие от них, все представители *M. zenkewitschii* входят в большую парафилетическую кладу, также содержащую *M. godlewskii*, и разделяются, по меньшей мере, на три достаточно сильно генетически отличающихся друг от друга группы, а несколько особей из северной котловины озера (Ушканьи острова и Хакусы) оказались генетически более близкими к *M. godlewskii* (Рис. 42 А). Было высказано предположение, что *M. zenkewitschii* является предковым для *M. godlewskii* (Пудовкина и др., 2015). При этом особи *M. baicalensis* из Северной котловины значительно отличаются от полихет этого вида из Южного и Среднего Байкала и нуклеотидная последовательность одной из спорных маломорских особей генетически более близка к ним, что может свидетельствовать о существовании «южной» и «северной» популяций этого вида, смешивающихся в районе Ольхонских ворот.

Все интронные последовательности на филогенетическом древе формируют только две группы (апостериорные вероятности=0.76): в первую входит большинство аллелей *M. godlewskii*, собранных в Малом Море и пади Жилище, а также 2 образца *M. zenkewitschii* из района Ушканьих островов, а также полихеты из оз. Баунт; во вторую – все представители *M. baicalensis* (Б. Голоустное, Нижнеангарск, Хакусы), *M. godlewskii* из пади Сенная, бухты Б. Коты, две аллели особей из Малого Моря с песчаными домиками и *M. zenkewitschii*, которые представлены единичными находками из нескольких удаленных друг от друга точек сбора: Муринская банка, Варначка, Ушканьи острова, Хакусы.

Одинаковые аллели интрона отмечены только у представителей одного вида из одной или даже очень удаленных точек сбора (например, *M. baicalensis* из Нижнеангарска и Хакусов).

Интересно, что особи, собранные в проливе Ольхонские ворота Малого Моря имели как песчаные, так и глинистые «домики»-трубки, характерные

для видов *M. baicalensis* и *M. godlewskii*, поэтому однозначно определить видовую принадлежность полихет не удалось из-за неполного развития половых признаков. Однако, в филогенетическом анализе, при использовании последовательностей CO1, три из четырех особей с песчаными «домиками» кластеризуются с *M. godlewskii*, как и особи собранные там же из глинистых «домиков», а одна — с *M. baicalensis* из Северной котловины. Такое противоречие может быть связано как с межвидовой гибридизацией сестринских видов, так и с тем, что материал, используемый для построения трубки, не является строго видоспецифичным, и в первую очередь определяется доступностью субстрата, в то время как два вышеуказанных вида могут обитать совместно.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) для особей, разделенных по видовой принадлежности в соответствии с митохондриальной филогенией, показал, что большая часть генетической изменчивости по последовательностям интрона (90.5%) приходится на внутривидовую вариацию, а межвидовая изменчивость, таким образом, составляет менее 10%.

Наблюдаемое несоответствие между митохондриальным и ядерным маркерами может соответствовать двум плохо различимым эволюционным сценариям: (1) сохранения предкового полиморфизма фрагментом ядерного генома и (2) межвидовой гибридизации. Кроме того, существуют значительные отличия в паттернах дифференциации между этими двумя типами маркеров. Эти отличия в первую очередь связаны с тем, что митохондриальный геном гаплоиден и передается только от одного из родителей, и, следовательно, имеет в четыре раза меньший эффективный размер популяции и более подвержен дрейфу.

Появление слабopоложительных мутаций в митохондриальном геноме будет приводить к стремительному селективному «подметанию». Когда полиморфизм снижается под действием отбора и аллели, имеющие селективное преимущество начинают преобладать в популяции. Однако

тесты на нейтральность ранее не выявили следов действия естественного отбора на митохондриальный геном (Пудовкина и др., 2015).

При отсутствии какой-либо зависимости генетических дистанций между последовательностями интрона от видовой принадлежности организмов, наиболее вероятным кажется неполное расхождение предковых линий и сохранение исходного полиморфизма маркером с большей эффективной численностью. Однако полученные данные не позволяют точно определить механизмы формирования наблюдаемого полиморфизма.

## Заключение

Впервые проведен анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей интронов ядерных генов байкальских беспозвоночных. Показано существенное сходство результатов анализа митохондриальных маркеров и интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы для одной из наиболее древних групп обитателей Байкала— амфипод. Однако интронные последовательности не всегда могут быть применимы для видовой идентификации более молодых групп: байкальских полихет и моллюсков подсем. *Baicaliinae*.

У трех видов полихет рода *Manayunkia* наиболее вероятно сохранение предкового полиморфизма интронным маркером, при высокой сегрегации митохондриальной ДНК, что отчасти может быть связано с особенностями биологии рассматриваемых видов: подвижными являются только мужские половые клетки.

Эволюционный возраст моллюсков подсем. *Baicaliinae* исчисляется несколькими миллионами лет (Зубаков и др., 1997), моллюски этого подсемейства существенно различаются по своим морфологическим и экологическим признакам, но имеют низкие генетические дистанции по последовательностям фрагментов мтДНК: изменчивость фолмеровского фрагмента гена CO1 в среднем составляет  $5.05 \pm 1.4\%$  замен (Зубаков и др., 1997; Hausdorf et al., 2003; Перетолчина и др., 2007).

Уровень межвидовой изменчивости интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы моллюсков подсем. *Baicaliinae* также оказался невысок  $1.81\% \pm 0.69$ . Внутривидовая изменчивость последовательностей интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы не превышает 1% нуклеотидных замен. Исключение составляют байкалиины *K. semenkewitschi*, у которых низкая вариабельность прочих маркеров (CO1 и ITS-1) позволяет предполагать вторичные нарушения репродуктивного барьера. Сходные противоречия выявлены и по межвидовым генетическим дистанциям видов рода

*Pseudobaikalia*. При этом у представителей трех видов обнаружен общий гаплотип интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы, что позволяет сделать вывод о сохранении предкового полиморфизма у части видов подсем. Baicaliinae. В ходе исследования на основании генетических данных и впервые обнаруженных морфологических различий описан новый вид подсем. Baicaliinae, *Pseudobaikalia michelae* **sp. n.** Sitnikova, Kovalenkova.

Использование быстро эволюционирующих ядерных маркеров оказалось достаточно информативно не только при исследовании эволюционно молодых групп видов, но и на внутривидовом уровне (для моллюсков *K. semenkewitschi* и амфипод *G. fasciatus*), отдельный интерес представляет сравнение результатов анализа ядерных и митохондриальных фрагментов, позволяющее выявлять случаи межвидовой интрогрессии.



## ВЫВОДЫ

1. Показано, что нуклеотидные последовательности интронов генов  $\alpha$  и  $\beta$ -субъединиц АТФ-синтазы являются информативными маркерами относительно быстрых эволюционных процессов у различных групп эндемичных байкальских беспозвоночных: амфипод надсем. Gammaroidea и моллюсков подсем. Baicaliinae.
2. Сравнение эволюционного дерева манаюнок, построенного с использованием интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы, с известным митохондриальным деревом показало, что достоверные различия между ними соответствуют различиям, ожидаемым при неполном разделении предковых линий.
3. Показано, что топология дерева, построенного на основании нуклеотидных последовательностей интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы, отличается от топологии митохондриального дерева моллюсков подсем. Baicaliinae, что указывает на митохондриальные интрогрессии у этих моллюсков в Байкале.
4. Впервые в результате совместного использования морфологических и молекулярных признаков получено полностью дихотомическое дерево моллюсков подсем. Baicaliinae, которое объясняет экологическую специализацию видов.
5. В единственном интроне гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы байкалийн обнаружена последовательность ретротранспозона, родственного семейству транспозонов MESC, широко распространенному у моллюсков.
6. Показано, что генетическая структура *Gmelinoides fasciatus* в Байкале, определенная на основании полиморфизма интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы в большей степени соответствует географической подразделенности озера, чем митохондриальное дерево вида.
7. Найден и описан новый вид *Pseudobaikalia michelae* **sp. n.** на основании генетических и впервые обнаруженных морфологических данных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbott R. et al. Hybridization and speciation //Journal of evolutionary biology. – 2013. – Vol. 26. № 2. – P. 229-246.
2. Alcaide M., Rodríguez A., Negro J. J. Sampling strategies for accurate computational inferences of gametic phase across highly polymorphic major histocompatibility complex loci //BMC research notes. – 2011. – Vol. 4. № 1. – P. 151.
3. Allio R. et al. Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker //Molecular biology and evolution. – 2017. – Vol. 34. № 11. – P. 2762-2772.
4. Ambrose C. D., Crease T. J. Evolution of the nuclear ribosomal DNA intergenic spacer in four species of the *Daphnia pulex* complex //BMC genetics. – 2011. – Vol. 12. № 1. – P. 13.
5. Andrews S. et al. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. – 2010.
6. Bandelt H. J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies //Molecular biology and evolution. – 1999. – Vol. 16. № 1. – P. 37-48.
7. Bedulina D. S. et al. On *Eulimnogammarus messerschmidti*, sp. n. (Amphipoda: Gammaridea) from Lake Baikal, Siberia, with redescription of *E. cyanoides* (Sowinsky) and remarks on taxonomy of the genus *Eulimnogammarus*//Zootaxa. – 2014. – Vol. 3838. № 5. – P. 518-544.
8. Bentlage B., Wörheide G. Low genetic structuring among *Pericharax heteroraphis* (Porifera: Calcarea) populations from the Great Barrier Reef (Australia), revealed by analysis of nrDNA and nuclear intron sequences //Coral Reefs. – 2007. – Vol. 26. № 4. – P. 807-816.
9. Betley J. N. et al. A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates //Current Biology. – 2002. – Vol. 12. № 20. – P. 1756-1761.

10. Bierne N. et al. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR //Molecular Ecology. – 2000. – Vol. 9. №. 2. – P. 233-235.
11. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data //Bioinformatics. – 2014. – V. 30. – №. 15. – P. 2114-2120.
12. Bolnick D. I., Fitzpatrick B. M. Sympatric speciation: models and empirical evidence //Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. – 2007. – V. 38. – P. 459-487.
13. Brooks J.L. Speciation in ancient lakes // Quart. Rev. Biol. –1950b. – Vol. 25. – № 1 – P. 30–60.
14. Brooks J.L. Speciation in ancient lakes // Quart. Rev. Biol. –1950a. – Vol. 25. – № 2 – P. 131–176.
15. Browning S. R., Browning B. L. Haplotype phasing: existing methods and new developments //Nature Reviews Genetics. – 2011. – Vol. 12. № 10. – P. 703.
16. Bruen T. C., Philippe H., Bryant D. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination //Genetics. – 2006. – Vol. 172. № 4. – P. 2665-2681.
17. Carmel L. et al. Three distinct modes of intron dynamics in the evolution of eukaryotes //Genome research. – 2007. – Vol. 17. № 7. – P. 1034-1044.
18. Chakraborty R., Weiss K. M. Genetic variation of the mitochondrial DNA genome in American Indians is at mutation-drift equilibrium //American Journal of Physical Anthropology. – 1991. – Vol. 86. №. 4. – P. 497-506.
19. Chen L. L., Carmichael G. G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA //Molecular cell. – 2009. – Vol. 35. №. 4. – P. 467-478.
20. Chen W., Luo L., Zhang L. The organization of nucleosomes around splice sites //Nucleic acids research. – 2010. – Vol. 38. № 9. – P. 2788-2798.
21. Coleman A. W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure //Trends in Genetics. – 2015. – Vol. 31. № 3. – P. 157-163.

22. Coleman A. W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure //Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35. № 10. – P. 3322-3329.
23. Colgan D. J. Genetic studies of Australian *Trichomya hirsuta* (Bivalvia: Mytilidae) suggest antitropical divergence of this species //Journal of Asia-Pacific Biodiversity. – 2018. – T. 11. – №. 1. – C. 146-150.
24. Coykendall D. K. et al. Genetic diversity and demographic instability in *Riftia pachyptila* tubeworms from eastern Pacific hydrothermal vents //BMC evolutionary biology. – 2011. – Vol. 11. № 1. – P. 96.
25. Coyne J. A. Sympatric speciation //Current Biology. – 2007. – Vol. 17. №. 18. – P. R787-R788.
26. Cristescu M. E. et al. Ancient lakes revisited: from the ecology to the genetics of speciation //Molecular Ecology. – 2010. – Vol. 19. №. 22. – P. 4837-4851.
27. Daneliya M. E., Kamaltynov R. M., Väinölä R. Phylogeography and systematics of *Acanthogammarus* s. str., giant amphipod crustaceans from Lake Baikal //Zoologica Scripta. – 2011. – Vol. 40. № 6. – P. 623-637.
28. David A. A. et al. Predicting the dispersal potential of an invasive polychaete pest along a complex coastal biome //Integrative and comparative biology. – 2016. – Vol. 56. № 4. – P. 600-610.
29. Dieckmann U., Doebeli M. On the origin of species by sympatric speciation //Nature. – 1999. – Vol. 400. № 6742. – P. 354.
30. Diedericks G., Daniels S. R. Ain't no mountain high enough, ain't no valley low enough? Phylogeography of the rupicolous Cape girdled lizard (*Cordylus cordylus*) reveals a generalist pattern //Molecular phylogenetics and evolution. – 2014. – Vol. 71. – P. 234-248.
31. Diniz-Filho J. A. F. et al. Mantel test in population genetics //Genetics and molecular biology. – 2013. – Vol. 36. №. 4. – P. 475-485.
32. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue //Phytochem Bull Bot Soc Am. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.

33. Duda T. F., Rolan E. Explosive radiation of Cape Verde *Conus*, a marine species flock //Molecular Ecology. – 2005. – Vol. 14. № 1. – P. 267-272.
34. Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations //Molecular ecology. – 2002. – Vol. 11. №. 12. – P. 2571-2581.
35. Excoffier L., Lischer H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows //Molecular ecology resources. – 2010. – Vol. 10. № 3. – P. 564-567.
36. Farias I. P., Ortí G., Meyer A. Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes //Journal of Experimental Zoology. – 2000. – Vol. 288. №. 1. – P. 76-92.
37. Farlow A. et al. The genomic signature of splicing-coupled selection differs between long and short introns //Molecular biology and evolution. – 2011. – Vol. 29. № 1. – P. 21-24.
38. Fay J. C., Wu C. I. Hitchhiking under positive Darwinian selection //Genetics. – 2000. – Vol. 155. №. 3. – P. 1405-1413.
39. Fazalova V. et al. When environmental changes do not cause geographic separation of fauna: differential responses of Baikalian invertebrates //BMC evolutionary biology. – 2010. – V. 10. №. 1. – P. 320.
40. Feio M. J. et al. Diatoms and macroinvertebrates provide consistent and complementary information on environmental quality //Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie. – 2007. – Vol. 169. № 3. – P. 247-258.
41. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author //http://www. evolution. gs. washington. edu/phylip. html. – 2004.
42. Flot J. F., Couloux A., Tillier S. Haplowebs as a graphical tool for delimiting species: a revival of Doyle's "field for recombination" approach and its application to the coral genus *Pocillopora* in *Clipperton* //BMC Evolutionary Biology. – 2010. – Vol. 10. № 1. – P. 372.

43. Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 3. – P. 294-299.
44. Foltz D. W. An ancient repeat sequence in the ATP synthase  $\beta$ -subunit gene of forcipulate sea stars // *Journal of molecular evolution*. – 2007. – Vol. 65. № 5. – P. 564-573.
45. Forsman Z. H. et al. Ecomorph or endangered coral? DNA and microstructure reveal Hawaiian species complexes: *Montipora dilatata/flabellata/turgescens* & *M. patula/verrilli* // *PLoS One*. – 2010. – Vol. 5. № 12. – P. e15021.
46. Freire R. et al. Sequence variation of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA in *Cerastoderma* species (Bivalvia: Cardiidae) // *Journal of Molluscan Studies*. – 2009. – Vol. 76. № 1. – P. 77-86.
47. Fu Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection // *Genetics*. – 1997. – Vol. 147. № 2. – P. 915–925.
48. Garrick R. C., Sunnucks P., Dyer R. J. Nuclear gene phylogeography using PHASE: dealing with unresolved genotypes, lost alleles, and systematic bias in parameter estimation // *BMC Evolutionary Biology*. – 2010. – Vol. 10. № 1. – P. 118.
49. Garrigan D., Lewontin R., Wakeley J. Measuring the sensitivity of single-locus “neutrality tests” using a direct perturbation approach // *Molecular biology and evolution*. – 2009. – Vol. 27. № 1. – P. 73-89.
50. Genner M. J., Turner G. F. Ancient hybridization and phenotypic novelty within Lake Malawi’s cichlid fish radiation // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – Vol. 29. № 1. – P. 195-206.
51. Getz W. M. et al. Sympatric speciation in structureless environments // *BMC evolutionary biology*. – 2016. – Vol. 16. № 1. – P. 50.

52. Gong C., Maquat L. E. lncRNAs transactivate STAUI-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements //Nature. – 2011. – Vol. 470. №. 7333. – P. 284.
53. Grant P. R., Grant B. R. Evolutionary biology: speciation undone //Nature. – 2014. – Vol. 507. № 7491. – P. 178.
54. Guindon S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 //Systematic biology. – 2010. – Vol. 59. №. 3. – P. 307-321.
55. Haddrill P. R. et al. Patterns of intron sequence evolution in *Drosophila* are dependent upon length and GC content //Genome biology. – 2005. – Vol. 6. № 8. – P. R67.
56. Harmon L. J. et al. Evolutionary diversification in stickleback affects ecosystem functioning //Nature. – 2009. – Vol. 458. № 7242. – P. 1167.
57. Hausdorf B., Röpstorf P., Riedel F. Relationships and origin of endemic Lake Baikal gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea) based on mitochondrial DNA sequences //Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2003. – Vol. 26. № 3. – P. 435-443.
58. Hedrick P. Genetics of populations. – Jones & Bartlett Learning, 2011. – 675 p.
59. Hertel K. J. Combinatorial control of exon recognition //Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283. № 3. – P. 1211-1215.
60. Hollins C. et al. U2AF binding selects for the high conservation of the *C. elegans* 3' splice site //Rna. – 2005. – Vol. 11. № 3. – P. 248-253.
61. Hooper D. M., Price T. D. Chromosomal inversion differences correlate with range overlap in passerine birds //Nature ecology & evolution. – 2017. – Vol. 1. № 10. – P. 1526.
62. Ibrahim K. M. Testing for recombination in short nuclear DNA sequence of the European meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* // Molecular Ecology. – 2002. – Vol. 11. – P. 583-590.

63. Irimia M., Roy S. W. Evolutionary convergence on highly-conserved 3' intron structures in intron-poor eukaryotes and insights into the ancestral eukaryotic genome //PLOS genetics. – 2008. – Vol. 4. № 8. – P. e1000148.
64. Jarman S. N., Ward R. D., Elliott N. G. Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns //Marine Biotechnology. – 2002. – Vol. 4. № 4. – P. 347-355.
65. Jiggins C. D. Sympatric speciation: why the controversy? //Current Biology. – 2006. – Vol. 16. №. 9. – P. R333-R334.
66. Joly S. JML: testing hybridization from species trees //Molecular Ecology Resources. – 2012. – Vol. 12. №. 1. – P. 179-184.
67. Joyce D. A. et al. Repeated colonization and hybridization in Lake Malawi cichlids //Current Biology. – 2011. – Vol. 21. № 3. – P. R108-R109.
68. Karr J. R., Chu E. W. Restoring life in running waters: better biological monitoring. – Island Press, 1998.
69. Katoh K., Standley D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability //Molecular biology and evolution. – 2013. – Vol. 30. № 4. – P. 772-780.
70. Kearse M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data //Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. № 12. – P. 1647-1649.
71. Kleindorfer S. et al. Species collapse via hybridization in Darwin's tree finches //The American Naturalist. – 2014. – Vol. 183. № 3. – P. 325-341.
72. Koblmüller S. et al. Past connection of the upper reaches of a Lake Tanganyika tributary with the upper Congo drainage suggested by genetic data of riverine cichlid fishes //African Zoology. – 2012. – Vol. 47. № 1. – P. 182-186.
73. Kravtsova L. S. et al. Macrozoobenthic communities of underwater landscapes in the shallow-water zone of southern Lake Baikal //Hydrobiologia. – 2004. – Vol. 522. № 1-3. – P. 193-205.



74. Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V. et al. Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal // Great Lakes Research. – 2014. – T. 40. – № :441-448.
75. Kunte K. et al. Sex chromosome mosaicism and hybrid speciation among tiger swallowtail butterflies // PLoS Genetics. – 2011. – Vol. 7. № 9. – P. e1002274.
76. Lamichhaney S. et al. A beak size locus in Darwin's finches facilitated character displacement during a drought // Science. – 2016. – Vol. 352. № 6284. – P. 470-474.
77. Lamichhaney S. et al. Rapid hybrid speciation in Darwin's finches // Science. – 2018. – Vol. 359. № 6372. – P. 224-228.
78. Lavrov D. V., Pett W. Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages // Genome biology and evolution. – 2016. – Vol. 8. № 9. – P. 2896-2913.
79. Lecointre G. et al. Is the species flock concept operational? The Antarctic shelf case // PloS one. – 2013. – Vol. 8. № 8. – P. e68787.
80. Lee H., Boulding E. G. Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers // Molecular Ecology. – 2009. – Vol. 18. №. 10. – P. 2165-2184.
81. Lessa E. P. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations // Molecular Biology and Evolution. – 1992. – Vol. 9. № 2. – P. 323-330.
82. Li H., Chen D., Zhang J. Analysis of Intron Sequence Features Associated with Transcriptional Regulation in Human Genes. PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. № 10. – P. e46784.
83. Li W, Kuzoff R, Wong CK, Tucker A, Lynch M. Characterization of newly gained introns in *Daphnia* populations // Genome biology and evolution. – 2014. – Vol. 6. № 9. – P. 2218-2234.

84. Li W, Tucker AE, Sung W, Thomas WK, Lynch M. Extensive, recent intron gains in *Daphnia* populations //Science. – 2009. – Vol. 326. № 5957. – P. 1260-1262.
85. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution //Molecular biology and evolution. – 2004. – Vol. 21. № 6. – P. 991-1007.
86. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data //Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25. № 11. – P. 1451-1452.
87. Losos J. B. Adaptive radiation, ecological opportunity, and evolutionary determinism: American Society of Naturalists EO Wilson Award address //The American Naturalist. – 2010. – Vol. 175. № 6. – P. 623-639.
88. Lowe T. M., Chan P. P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes //Nucleic acids research. – 2016. – Vol. 44. № W1. – P. W54-W57.
89. Lücke J. D., Johnson R. K. Detection of ecological change in stream macroinvertebrate assemblages using single metric, multimetric or multivariate approaches //Ecological Indicators. – 2009. – Vol. 9. № 4. – P. 659-669.
90. Luo Y, Li C, Gong X, Wang Y, Zhang K. Splicing-related features of introns serve to propel evolution //PloS one. – 2013. – Vol. 8. № 3. – P. e58547.
91. Macdonald K. S., Yampolsky L., Duffy J. E. Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal //Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2005. – Vol. 35. № 2. – P. 323-343.
92. Malinsky M. Genomic islands of speciation separate cichlid ecomorphs in an East African crater lake / Malinsky M. (et al. Challis RJ, Tyers AM, Schiffels S, Terai Y, Ngatunga BP, Miska EA, Durbin R, Genner MJ, Turner GF ) //Science. – 2015. – Vol. 350. № 6267. – P. 1493-1498.
93. Mariner P. D. et al. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock //Molecular cell. – 2008. – Vol. 29. №. 4. – P. 499-509.

94. Martens K. Speciation in ancient lakes //Trends in Ecology & Evolution. – 1997. – Vol. 12. № 5. – P. 177-182.
95. Martin C. H., Wainwright P. C. Trophic novelty is linked to exceptional rates of morphological diversification in two adaptive radiations of *Cyprinodon* pupfish //Evolution. – 2011. – Vol. 65. №. 8. – P. 2197-2212.
96. Martin C. H. et al. Complex histories of repeated gene flow in Cameroon crater lake cichlids cast doubt on one of the clearest examples of sympatric speciation //Evolution. – 2015. – Vol. 69. № 6. – P. 1406-1422.
97. Martin<sup>b</sup> D. P. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes //Virus evolution. – 2015. – Vol. 1. № 1.
98. Matetovici I. et al. Mobile element evolution playing jigsaw—SINEs in gastropod and bivalve mollusks //Genome biology and evolution. – 2016. – Vol. 8. №. 1. – P. 253-270.
99. Matute D. R. et al. A test of the snowball theory for the rate of evolution of hybrid incompatibilities //Science. – 2010. – Vol. 329. № 5998. – P. 1518-1521.
100. McInerney C. E. et al. Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs //Heredity. – 2011. – Vol. 106. №. 1. – P. 78.
101. Meier J. I. et al. Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations //Nature communications. – 2017. – Vol. 8. – P. 14363.
102. Mindell D. P., Honeycutt R. L. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications //Annual Review of Ecology and Systematics. – 1990. – Vol. 21. № 1. – P. 541-566.
103. Mourguiart P. Historical changes in the environment of Lake Titicaca: evidence from ostracod ecology and evolution //Advances in ecological research. – 2000. – Vol. 31. – P. 497-520.
104. Mullis K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction //Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. – Vol. 51. – P. 263-273.

105. Murphy J. F. et al. Development of a biotic index using stream macroinvertebrates to assess stress from deposited fine sediment //Freshwater biology. – 2015. – Vol. 60. № 10. – P. 2019-2036.
106. Naumenko S. A. et al. Transcriptome-based phylogeny of endemic Lake Baikal amphipod species flock: fast speciation accompanied by frequent episodes of positive selection //Molecular ecology. – 2017. – Vol. 26. № 2. – P. 536-553.
107. Nguyen H. D., Yoshihama M., Kenmochi N. New maximum likelihood estimators for eukaryotic intron evolution //PLoS computational biology. – 2005. – Vol. 1. № 7. – P. e79.
108. Nishihara H. et al. MetaSINEs: broad distribution of a novel SINE superfamily in animals //Genome biology and evolution. – 2016. – Vol. 8. № 3. – P. 528-539.
109. Novák P. et al. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads //Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29. № 6. – P. 792-793.
110. Oksanen J. et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-2 //R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. – 2010.
111. Pacheco N. M., Congdon B. C., Friesen V. L. The utility of nuclear introns for investigating hybridization and genetic introgression: a case study involving *Brachyramphus murrelets* //Conservation Genetics. – 2002. – Vol. 3. № 2. – P. 175-182.
112. Palumbi S. R., Baker C. S. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales //Molecular Biology and Evolution. – 1994. – Vol. 11. № 3. – P. 426-435.
113. Palumbi S. R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction //Molecular systematics. – 1996. – C. 205-247.
114. Paradis E. pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach //Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. № 3. – P. 419-420.

115. Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language //Bioinformatics. – 2004. – Vol. 20. № 2. – P. 289-290.
116. Parsch J. et al. On the utility of short intron sequences as a reference for the detection of positive and negative selection in *Drosophila* //Molecular biology and evolution. – 2010. – Vol. 27. № 6. – P. 1226-1234.
117. Polotow D., Carmichael A., Griswold C. E. Total evidence analysis of the phylogenetic relationships of Lycosoidea spiders (Araneae, Entelegynae) //Invertebrate Systematics. – 2015. – Vol. 29. №. 2. – P. 124-163.
118. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging //Molecular biology and evolution. – 2008. – Vol. 25. №. 7. – P. 1253-1256.
119. Pek J. W. et al. Stable intronic sequence RNAs have possible regulatory roles in *Drosophila melanogaster* //J Cell Biol.–2015.–Vol. 211.№. 2. – P. 243-251.
120. Poelstra J. W. et al. The genomic landscape underlying phenotypic integrity in the face of gene flow in crows //Science. – 2014. – Vol. 344. № 6190. – P. 1410-1414.
121. Prychitko T. M., Moore W. S. The utility of DNA sequences of an intron from the  $\beta$ -fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae) //Molecular phylogenetics and evolution. – 1997. – Vol. 8. № 2. – P. 193-204.
122. Ramos-Onsins S. E., Rozas J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth //Molecular biology and evolution. – 2002. – Vol. 19. №. 12. – P. 2092-2100.
123. Reisser C. M. O. et al. Connectivity, small islands and large distances: the *Cellana strigilis* limpet complex in the Southern Ocean //Molecular ecology. – 2011. – Vol. 20. № 16. – P. 3399-3413.
124. Revell L. J. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things) //Methods in Ecology and Evolution. – 2012. – Vol. 3. №. 2. – P. 217-223.

125. Rogozin I. B. et al. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution //Current Biology. – 2003. – Vol. 13. № 17. – P. 1512-1517.
126. Romanova E. V. et al. Evolution of mitochondrial genomes in Baikalian amphipods //BMC genomics. – 2016. – Vol. 17. № 14. – P. 1016.
127. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models //Bioinformatics. – 2003. – Vol. 19. №. 12. – P. 1572-1574.
128. Rosenberg N. A., Nordborg M. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms //Nature Reviews Genetics. – 2002. – Vol. 3. №. 5. – P. 380.
129. Saloom M. E., Scot Duncan R. Low dissolved oxygen levels reduce anti-predation behaviours of the freshwater clam *Corbicula fluminea* //Freshwater Biology. – 2005. – Vol. 50. № 7. – P. 1233-1238.
130. Scheet P., Stephens M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase //The American Journal of Human Genetics. – 2006. – Vol. 78. № 4. – P. 629-644.
131. Schirrmeister B. E. et al. Gene copy number variation and its significance in cyanobacterial phylogeny //BMC microbiology. – 2012. – Vol. 12. № 1. – P. 177.
132. Schultz J. et al. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota //Rna. – 2005. – Vol. 11. № 4. – P. 361-364.
133. Seehausen O. African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research //Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 2006. – Vol. 273. № 1597. – P. 1987-1998.
134. Seehausen O. et al. Speciation through sensory drive in cichlid fish //Nature. – 2008. – Vol. 455. № 7213. – P. 620.
135. Sefc K. M. et al. Species-specific population structure in rock-specialized sympatric cichlid species in Lake Tanganyika, East Africa //Journal of Molecular Evolution. – 2007. – Vol. 64. № 1. – P. 33-49.

136. Sequeira F., Ferrand N., Harris D. J. Assessing the phylogenetic signal of the nuclear  $\beta$ -Fibrinogen intron 7 in salamandrids (Amphibia: Salamandridae) //Amphibia-reptilia. – 2006. – Vol. 27. № 3. – P. 409-418.
137. Sherbakov D. Y. Molecular phylogenetic studies on the origin of biodiversity in Lake Baikal //Trends in ecology & evolution. – 1999. – Vol. 14. № 3. – P. 92-95.
138. Sheveleva N. G., Pomazkova G. I., Melnik N. G. Eco-taxonomical Review of Rotatoria, Cladocera, Calanoida and Cyclopoida of Lake Baikal //陸水学雑誌. – 1995. – Vol. 56. № 1. – P. 49-62.
139. Sitnikova T. Y. Endemic gastropod distribution in Baikal //Hydrobiologia. – 2006. – Vol. 568. № 1. – P. 207-211.
140. Sitnikova T., Maximova N. On morphological and ecological evidence of adaptive differentiation among stony cliff littoral Baikal gastropods //Journal of natural history. – 2016. – Vol. 50. № 5-6. – P. 263-280.
141. Slade RW, Moritz C, Heidemann A, et al. Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species //Molecular Ecology. – 1993. – Vol. 2. № 6. – P. 359-373.
142. Slatkin M., Hudson R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations //Genetics. – 1991. – V. 129. №. 2. – P. 555-562.
143. Smadja C. M., Butlin R. K. A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow //Molecular ecology. – 2011. – Vol. 20. № 24. – P. 5123-5140.
144. Sokal R. R. Testing statistical significance of geographic variation patterns //Systematic Zoology. – 1979. – Vol. 28. №. 2. – P. 227-232.
145. Steinman A. D. et al. Influence of cattle grazing and pasture land use on macroinvertebrate communities in freshwater wetlands //Wetlands. – 2003. – Vol. 23. № 4. – P. 877-889.
146. Stelbrink B. et al. Conquest of the deep, old and cold: an exceptional limpet radiation in Lake Baikal //Biology letters. – 2015. – Vol. 11. № 7. – P. 20150321.

147. Stelkens R. B. et al. Phenotypic novelty in experimental hybrids is predicted by the genetic distance between species of cichlid fish //BMC evolutionary biology. – 2009. – Vol. 9. № 1. – P. 283.
148. Stephens M., Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data //The American Journal of Human Genetics. – 2003. – Vol. 73. № 5. – P. 1162-1169.
149. Stephens M., Smith N. J., Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data //The American Journal of Human Genetics. – 2001. – Vol. 68. № 4. – P. 978-989.
150. Sun Y. et al. Intron evolution in *Neurospora*: the role of mutational bias and selection //Genome research. – 2015. – Vol. 25. № 1. – P. 100-110.
151. Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations //Genetics. – 1983. – Vol. 105. №. 2. – P. 437-460.
152. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism //Genetics. – 1989. – Vol. 123. № 3. – P. 585-595.
153. Taniguchi-Ikeda M. et al. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy //Nature. – 2011. – Vol. 478. №. 7367. – P. 127.
154. Tay W. T. et al. Exon-primed intron-crossing (EPIC) PCR markers of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) //Bulletin of entomological research. – 2008. – Vol. 98. №. 5. – P. 509-518.
155. Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? // Journal of Great Lakes Research. – 2016. – № 42. – P. 487-497.
156. Teske P. R., Beheregaray L. B. Intron-spanning primers for the amplification of the nuclear ANT gene in decapod crustaceans //Molecular ecology resources. – 2009. – Vol. 9. № 3. – P. 774-776.
157. Verheyen E. et al. Origin of the superflock of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa //Science. – 2003. – Vol. 300. № 5617. – P. 325-329.



158. Von Bertrab G. M., Von Krein A., Stendera S. et al. Is fine sediment deposition a main driver for the composition of benthic macroinvertebrate assemblages? //Ecological indicators. – 2013. – Vol. 24. – P. 589-598.
159. Wang J. Estimation of effective population sizes from data on genetic markers //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2005. – Vol. 360. №. 1459. – P. 1395-1409.
160. Watterson G. A. On the number of segregating sites in genetical models without recombination //Theoretical population biology. – 1975. – Vol. 7. №. 2. – P. 256-276.
161. Wentz-Hunter K., Potashkin J. The evolutionary conservation of the splicing apparatus between fission yeast and man //Nucleic acids symposium series. – 1995. № 33. – P. 226-228.
162. Whitney K. D. et al. Patterns of hybridization in plants //Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. – 2010. – Vol. 12. № 3. – P. 175-182.
163. Wörheide G., Epp L. S., Macis L. Deep genetic divergences among Indo-Pacific populations of the coral reef sponge *Leucetta chagosensis* (Leucettidae): founder effects, vicariance, or both? //BMC evolutionary biology. – 2008. – Vol. 8. № 1. – P. 24.
164. Xing J. et al. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome //Genome research. – 2009. – Vol. 19. № 9. – P. 1516-1526.
165. Yoshii K. Stable isotope analyses of benthic organisms in Lake Baikal //Hydrobiologia. – 1999. – Vol. 411. – P. 145-159.
166. Yu Y, Maroney P, Denker J et al. Dynamic regulation of alternative splicing by silencers that modulate 5' splice site competition //Cell. – 2008. – Vol. 135. № 7. – P. 1224-1236.
167. Zhang Y., Sun J., Chen C. et al. Adaptation and evolution of deep-sea scale worms (Annelida: Polynoidae): insights from transcriptome comparison with a shallow-water species //Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 46205.

168. Zouros E. Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations // *Genetics*. – 1979. – Vol. 92. №. 2. – P. 623-646.
169. Базикалова А.Я. Амфиподы озера Байкал // *Тр. Байк. лимнол. станции АН СССР*. – 1945. – Т. 11. – С. 1–440.
170. Гоманенко Г.В. Популяционная структура байкальского бокоплава *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) // *Генетика*. – 2005. – Т. 41. – № 7. – С. 1–6.
171. Дорогостайский В. Ч. Вертикальное и горизонтальное распределение фауны оз. Байкала // *Сборник трудов профессоров и преподавателей гос. Иркутского университета*. – 1923. – С. 103-131.
172. Зайдыков И. Ю., Майор Т. Ю., Суханова Л. В. и др. Полиморфизм мтДНК эпишуры озера Байкал– ключевого эндемичного вида планктонного сообщества // *Генетика*. – 2015. – Т. 51. № 9. – С. 1087-1090.
173. Зубаков Д. Ю., Щербаков Д. Ю., Ситникова Т. Я. Анализ филогенетических взаимоотношений байкальских эндемичных моллюсков сем. Baicaliidae на основе нуклеотидных последовательностей фрагмента митохондриального гена CO1 // *Молекулярная биология*. – 1997. – Т. 31. № 6. – С. 32-36.
174. Камалтынов Р.М. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Озеро Байкал. – Новосибирск: Наука, 2001. – Т. 1, кн. 1. – С. 572 – 831.
175. Кожов М. М. моллюски озера Байкал // *Тр. Байкал. лимнол. ст. АН СССР*. – 1936. – Т. 8. – С. 1-320.
176. Кожов М. М. Биология озера Байкал. – Изд-во Академии наук СССР, 1962. 315 с
177. Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В., Помазкина Г.В., Домышева В.М., Кравченко О.С., Грачев М.А. Нарушение вертикальной зональности зеленых водорослей в открытом Лиственничном заливе озера Байкал, как следствие локального антропогенного воздействия. // *Доклады Академии наук (Общая биология)*. – 2012. – Т. 447. – № 2. – С. 227-229.

178. Кравцова Л. С. Букин Ю. С., Перетолчина Т. Е. и др. Генетическая дифференциация популяций байкальского эндемика *Sergentia baicalensis* Tshern.(Diptera, Chironomidae) // Генетика. – 2015. – Т. 51. № 7. – С. 826-826.
179. Ламакин В. В. Ледниковые отложения в береговой полосе Байкала //Тр. Комис. по изуч. четвертичного периода. М. – 1963. – С. 126-147.
180. Перетолчина Т. Е., Букин Ю.С., Ситникова Т.Я., Щербаков Д.Ю.. Генетическая дифференциация эндемичного байкальского моллюска *Baicalia carinata* (Mollusca: Caenogastropoda) //Генетика. – 2007. – Т. 43. № 12. – С. 1667-1675.
181. Петунина Ж.В. Сравнительный анализ генетического разнообразия байкальских амфипод *Gmelinoides fasciatus* и их паразитов, микроспоридий, в озере байкал: Дис. ... канд. биол. наук. 03.02.08. Иркутск, 2015.— 156с.
182. Попова С. М. Кайнозойская континентальная малакофауна юга Сибири и сопредельных территорий: систематический состав, биостратиграфия, история малакофауны, палеолимнология. – Наука, 1981. 186 с.
183. Пудовкина Т.А., Ситникова Т.Я., Матвеев А.Н. и др. Родственные связи байкальских полихет рода *Manayunkia* [Polychaeta: Sedentaria: Sabellidae] по данным анализа CO1 с анализом истории расселения //Экол. генетика. – 2014. – Т. 12. № 3 – С. 32-42..
184. Рассказов С. В. и др. Отложения Танхойского третичного поля, Южнобайкальская впадина: стратиграфия, корреляции и структурные перестройки в Байкальском регионе //Геодинамика и тектонофизика. – 2014. – Т. 5. № 4.
185. Ситникова Т.Я. Переднежаберные брюхоногие моллюски (Gastropoda: Prosobranchia) Байкала: морфология, таксономия, биология и формирование фауны: Дис. ... докт. биол. наук. 03.00.08. – Иркутск., 2004. – 242 с.
186. Ситникова Т. Я., Щербаков Д. Ю., Харченко В. В. О таксономическом статусе полихет рода *Manayunkia* (Sabellidae, Fabriciinae) из Байкала //Зоол. журнал. – 1997. – Т. 76. № 1. – С. 16-27.

187. Тимошкин О.А. Озеро Байкал: разнообразие фауны, проблема ее несмешиваемости и происхождения, экология и «экзотические» сообщества // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / ред. О.А. Тимошкин. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 2001. – Т. 1, кн. 1. – С. 16–73.
188. Тимошкин О. А. и др. Массовое развитие зеленых нитчатых водорослей родов *Spirogyra* и *Stigeoclonium* (Chlorophyta) в прибрежной зоне южного Байкала // Гидробиологический журнал. – 2014. № 50, № 5. – С. 15-26.
189. Тахтеев В. В. Очерки о бокоплавах озера Байкал: Систематика, сравнительная экология, эволюция. – Изд-во Иркутского ун-та, 2000. – 355 с.
190. Тетерина В. И., Суханова Л. В., Кирильчик С. В. Полиморфизм микросателлитной ДНК эндемичного рода рыб озера Байкал-голомянок (*Comephorus* Lacepede, 1801) // Ecological genetics. – 2007. – Т. 5. № 2.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Таксономические данные байкальских амфипод суперсемейства Gammaroidea и длина интрона гена  $\beta$ - субъединицы АТФ-синтазы.

Семейство	Видовое название	Длина интрона (п.н.)
сем. Аcantogammaridae	<i>Воескаxellia elegans</i> (подсем. Аcantogammarinae)	307
	<i>Garjajewia cabanisii</i> (подсем. Plesiogammarinae)	308
	<i>Oxiacanthus flavus</i> (подсем. Аcantogammarinae)	305
	<i>Palicarinus puzyllii</i> (подсем. Parapallaseinae)	309
сем. Eulimnogammaridae	<i>Eulimnogammarus cherskii</i> (подсем. Eulimnogammarinae)	311
	<i>Eulimnogammarus cyaneus</i> (подсем. Eulimnogammarinae)	296
	<i>Eulimnogammarus maackii</i> (подсем. Eulimnogammarinae)	307
	<i>Eulimnogammarus olivaceus</i> (подсем. Eulimnogammarinae)	308
	<i>Eulimnogammarus vitattus</i> (подсем. Eulimnogammarinae)	309
	<i>Polyacanthisca calceolata</i> (подсем. Abissogammarinae)	306
сем. Pallaseidae	<i>Pallaseopsis grubii</i> (-)	309
	<i>Pallaseopsis kesslerii</i> (-)	310
сем. Micruropodidae	<i>Gmelinoides fasciatus</i> (подсем. Gmelinoidinae)	304
	<i>Linevichella vortex</i> (подсем. Micruropodinae)	306

Таблица 2. Станции сбора образцов *Gmelinoides fasciatus*, использованных для амплификации интрона гена  $\beta$ -субъединицы АТФ-синтазы и фрагмента гена CO1.

Станция сбора материала	Количество последовательностей интрона	Количество последовательностей CO1
Северный Байкал	29	-
б. Ая	4	-
г. Богучанская	1	-
б. Коса	1	-
м. Елохин	10	-
м. Покойники	6	4
Устье р. Тья	3	-
Якшакан	1	-
Чивыркуйский залив	3	-
Средний Байкал	34	-
Устье р. Баргузин	4	-
Устье р. Безымянка	1	-
м. Боро-Елга	7	-
м. Зундук	8	2
Максимиha	5	-
о. Ольхон	1	-
з. Провал	4	-
Сахюрта	3	-
г. Таланка	1	-
Южный Байкал	13	-
б. Бабушка	4	-

Продолжение таблицы 2.

Станция сбора материала	Количество последовательностей интрона	Количество последовательностей CO1
Большое Голоустное	1	-
Листвянка	4	-
Мишиха	1	-
б. Песчаная	1	-
Танхой	2	-
Прибайкалье	5	-
Оз. Щучье	2	2
Оз. Гусиное	2	1
р. Мегет	1	-

Таблица 3. Станции сбора образцов моллюсков подсем. *Baicaliinae*, использованных для амплификации интронных последовательностей.

Вид	Место сбора; глубина; тип грунта
<i>Baicalia carinata</i>	м. Арул; 21-24м; песок, камни, губки
	г. Семисосенная; 23-24м; заиленный песок
	г. Якшакан; 20-25м; песок
<i>Baicalia dybowskiana</i>	г. Семисосенная; 23-24м; заилен.песок
<i>Baicalia turriiformis</i>	б. Половинная; 10м; песок
<i>Godlewskia wrzeniowskii</i>	Пр. Ольхонские ворота; 37-38м; заиленный песок
<i>Korotnewia angigira</i>	Баргузинский залив; 24м; песок
<i>Korotnewia korotnewii</i>	м. Арул; 52-56м; песок
	Пр. Ольхонские ворота; 28.3-30.8м; мелкий песок
	г. Онокачанская, 8-12м; мелкий заиленный песок
<i>Korotnewia semenkewitschi</i>	м. Боро-Елга; 18-8.8м; камни, губки, крупный песок
	м. Бабушкин; 15-20м; песок
	ок. Утулик; 13-18м; песок
	ок. п. Листвянка; 3 м; серый заиленный песок
	п. Култук; 11-27м; камни, губки, крупный песок, макрофиты
	Баргузинский залив; 20-18м; песок
	Пр. Ольхонские ворота; 7-11м; заиленный песок
	г. Онокачанская, 10-15м; мелкий заиленный песок
	Баргузинский залив; 24-25м; песок
	б. Ая; 16-14.6м; заиленный серый песок
	м. Немнянка; 30-12м; крупный песок, валуны
б. Ая; 14м; крупный песок	
<i>Liobaikalia steidae</i>	ок. Порт-Байкал; 8м; песок
<i>Maackia herderiana</i>	ок. Листвянка; 5-20м; камни, скалы



Продолжение таблицы 3.

Вид	Место сбора; глубина; тип грунта
<i>Maackia herderiana</i>	м.Арул, 21-24м, песок, камни, губки
<i>Parabaikalia dubiosa</i>	м. Боро-Елга, 18-8.8м, камни, губки, крупный песок
	Загли, 02.09.12, 10-12 м, кр песок, камни
	м. Немнянка; 30-12м; крупный песок, валуны
<i>Parabaikalia elata</i>	б. Песчаная; 8.6м; песок
<i>Parabaikalia florii florii</i>	м. Боро-Елга; 18-8.8м; камни, губки, крупный песок
<i>Parabaikalia kobeltiana</i>	м. Боро-Елга, 18-8.8м, камни, губки, крупный песок
<i>Parabaikalia oviformis</i>	б. Песчаная; 8.6м; песок
<i>Pseudobaicalia contabulata</i>	м.Зундук, 10-12м, песок, губки, 02.09.12
	г. Ая; 8-14м; заиленный песок
	г. Онокачанская; 10-15м; песок
	Ольхонские ворота; 11м; крупный песок
<i>Pseudobaikalia jentteriana</i>	Пр. Ольхонские ворота; 37-38м; заиленный песок
<i>Ps. michelae</i> <b>sp. n.</b>	Култук; 11-27м; камни, губки, крупный песок, макрофиты
<i>Pseudobaikalia tenuicosta u pulla</i>	Пр. Ольхонские ворота; 37-38м; заиленный песок
	м. Нижнее Изголовье п-ова Святой нос; 9-14 м; песок, ил
	г. Онокачанская; 10-15м; песок
	ок. п. Листвянка; 10-14м; песок, ил
<i>Pseudobaicalia zachwatkini</i>	ок. п. Листвянка; 10-14м; песок, ил
	Между г. Северобайкальск и г. Нижнеангарск; 5-9м; гравий
<i>Teratobaikalia ciliata</i>	б. Половинная; 10м; песок
	ок. Листвянка; 5-20м; камни, скалы
	Напротив р. Ледяная; 25-18м; скалы
	м. Ижимей; 40-20м; валуны, скалы
<i>Teratobaikalia duthiersii</i>	б.Песчаная; 9-11м; средний песок, гравий
	залив Култук; 27-11м; камни, крупный песок, макрофиты

Таблица 4. Морфологические и экологические признаки моллюсков подсем. Baicaliinae

	Номер признака	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	<i>Baicalia carinata</i>	0	1	1	3	1	3	2	0	0	1	0	3	3	3	1	1	1	2	2	0	1	1
2	<i>Baicalia dybowskiana</i>	3	1	1	3	1	3	2	0	0	1	0	1	2	3	1	1	1	2	2	2	0	1
3	<i>Baicalia turriiformis</i>	4	1	1	3	1	3	2	0	0	1	0	2	3	3	1	1	1	2	2	1	1	0
4	<i>Godlewskia pulchella</i>	3	2	0	3	0	2	2	0	0	0	2	0	3	2	1	1	1	2	3	0	1	1
5	<i>Korotnewia angigyra</i>	0	3	0	2	1	0	1	0	0	0	0	1	3	1	1	1	1	2	2	0	1	1
6	<i>Korotnewia korotnewii</i>	1	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	1	1	2	2	0	1	1
7	<i>Korotnewia semenkewitschi</i>	1	3	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	0	0	1
8	<i>Liobaikalia steidae</i>	1	5	0	2	1	3	2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1
9	<i>Maackia herderiana</i>	3	3	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	2	1	1	1	1	1	0	0
10	<i>Parabaikalia dubiosa</i>	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	0	0	0
11	<i>Parabaikalia elata</i>	0	3	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	3	1	1	1	2	2	0	0	0
12	<i>Parabaikalia florii</i>	0	0	0	2	1	0	1	0	1	0	0	3	1	3	1	1	1	2	2	0	0	0
13	<i>Parabaikalia kobeltiana</i>	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	0	3	1	3	1	1	1	2	2	0	0	0

Продолжение таблицы 4.

	Номер признака	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
14	<i>Pseudobaicalia contabulata</i>	3	3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0
15	<i>Pseudobaikalia jentteriana</i>	0	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	1	0	1	1
16	<i>Pseudobaikalia michelae</i> n.sp.	3	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	2	1	0
17	<i>Pseudobaikalia pulla</i>	3	3	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
18	<i>Pseudobaicalia zachwatkini</i>	3	3	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	2	0	0
19	<i>Teratobaikalia duthiersii</i>	3	4	0	0	2	2	0	0	0	2	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0
20	<i>Teratobaikalia ciliata</i>	3	4	0	1	2	1	1	0	0	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0

Морфологические и экологические признаки, использованные для анализа представителей подсем. Baicaliinae

1. Скульптура телеоконха: 0 — всегда гладкая, 1 — периостракальные волоски; 2 — периостракальные волоски на ребрах, 3 — ребра, 4 — валики
2. Форма телеоконха: 0 — широко-коническая, 1 — узко-коническая, 2 — веретеновидная, 3 — высоко-коническая, 4 — кубаревидная, 5 — штопоровидная;
3. Наличие подшовного канта: 0 — отсутствует, 1 — присутствует.
4. Форма протоконха: 0 — конический, 1 — шаровидный, 2 — высокий
5. Скульптура протоконха: 0 — отсутствует, 1 — слабовыражена, 2 — хорошо заметна

6. Форма устья: 0 — овальное, без уголков, 1 — с уголком внизу, 2 — округлое, 3 — неправильно-четырехугольное
7. Отношение высоты завитка к высоте устья: 0 — 1, 1 — больше в 2–3 раза, 2 — больше приблизительно в 4 раза, 3 — больше в 5 раз.
8. Форма крышечки: 0 — погруженная, 1 — непогруженная
9. Расположение семяприемников: 0 — отдельно, 1 — в «пучке»
10. Размер петли ренального гонодукта: 0 — маленькая, 1 — средняя, 2 — большая
11. Ширина петли ренального гонодукта: 0 — средняя, 1 — узкая, 2 — широкая
12. Высота телеоконха (мм): 0 — 6-10, 1 — 10-15, 2 — 15-20, 3 — более 20
13. Среднее количество оборотов (шт.): 0 — 4-5, 1 — 5-6, 2 — 6-7, 3 — более 8
14. Высота протоконха: 0 — менее 0.6 мм, 1 — 0.6-0.8, 2 — 0.8-1, 3 — 1-1.2.
15. Ширина капсульной железы по отношению к белковой 0—1/3-1/2, 1 — 3/4-1, 2 — более 1
16. Капсульная железа разделена на зоны: 0 — слабо, 1 — отчетливо.
17. Наличие петель яйцевода: 0 — отсутствуют, 1 — присутствует.
18. Насколько семяприемники расширяют яйцевод 0—незначительно, 1—в 2-3 р, 2—в 3 и более раз.
19. Наибольшее количество семяприемников: 0 — 2-4, 1 — 6-7, 2 — 10-15
20. Тип субстрата: 0 — песок, 1 — камни, 2 — смешанные камни и песок.
21. Верхняя граница глубин обитания преимущественно: 0 — 1-5 м, 1 — более 10
22. Нижняя граница глубин обитания преимущественно: 0 — менее 50 м, 1 — более 50 м.

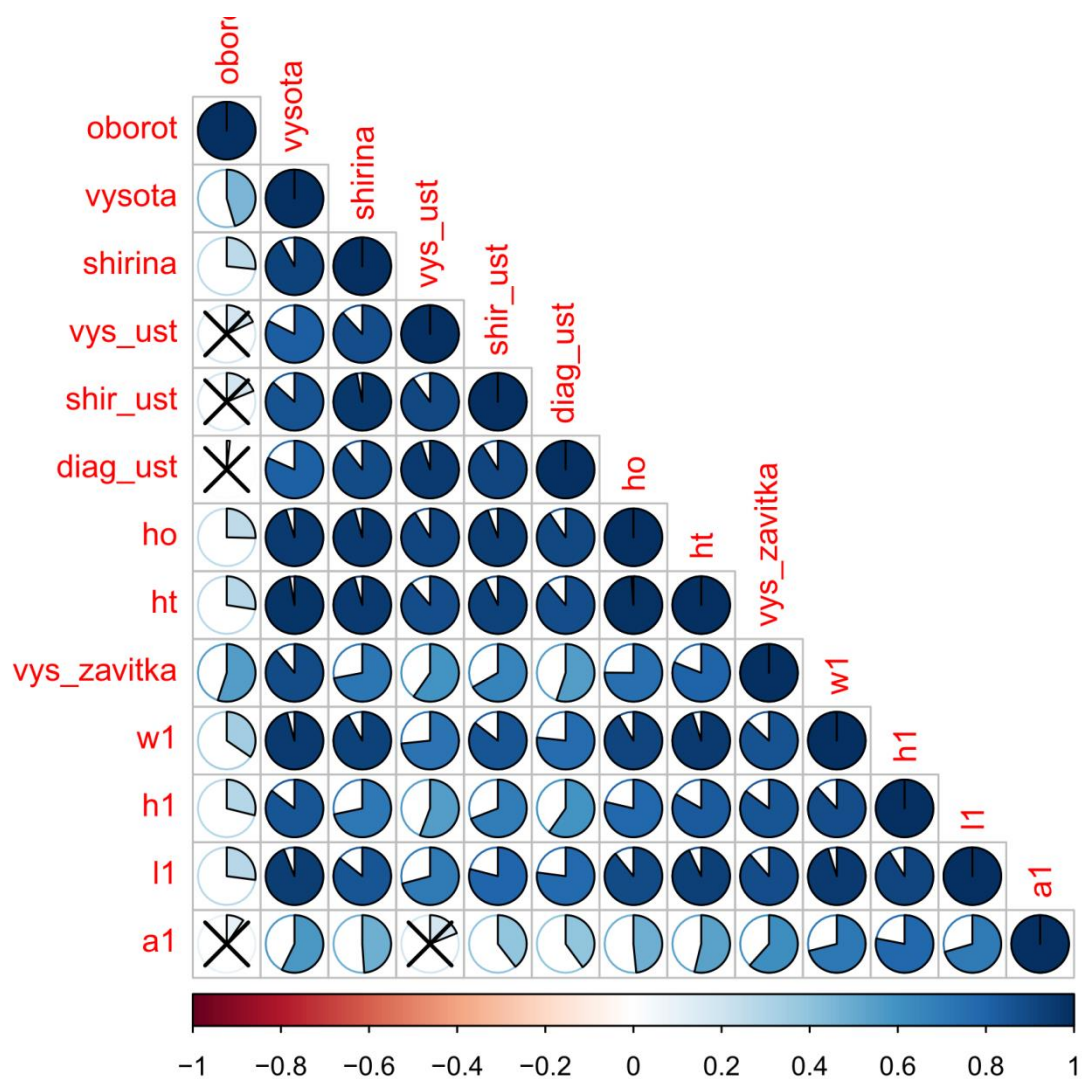


Рис. 1. Матрица корреляций морфометрических признаков *Korotnewia semenkewitschi*. Недостоверные значения отмечены крестиком.

Таблица 5. Морфометрические признаки *Korotnewia semenkewitschi*.

ID	Станция	Кол-во оборот	H	W	ah	aw	al	ho	ht	hz	wl	h1	l1	a1
Ks42	Аяя	5,5	8,89	4,53	3,15	2,7	3,39	5,74	7,17	3,16	2,96	1,5	1,72	0,4
Ks16		5,5	9,89	4,87	3,63	2,8	3,86	6,21	7,85	3,68	3,2	1,75	1,98	0,4
Ks17		6	10,69	5,17	3,52	2,84	3,6	6,43	8,25	4,28	3,41	1,94	2,22	0,48
Ks18		5	8,13	4,16	2,87	2,26	3,05	5,08	6,39	3,05	2,78	1,37	1,66	0,41
Ks84	Баргузинс кий залив	4	5,97	3,31	2,18	1,78	2,34	4,05	5,06	1,89	2,16	1,13	1,13	0,32
Ks26		4,2	6,96	3,53	2,79	2,11	2,73	4,72	5,85	2,25	2,23	1,26	1,42	0,3
Ks27		5,5	9,39	5,29	4,14	3,3	4,29	6,5	7,81	2,93	2,96	1,25	1,6	0,22
Ks32	Фролиха	5,5	8,21	4,1	2,71	2,19	2,73	4,98	6,4	3,27	2,79	1,58	1,68	0,39
Ks47	Немнянка	5	6,84	3,48	2,24	1,94	2,35	4,29	5,46	2,55	2,34	1,35	1,41	0,32
Ks13		4,5	6,17	3,64	2,31	1,98	2,47	4,1	5,11	2,09	2,2	1,17	1,24	0,28
Ks39		5	7,29	3,92	2,55	2,22	2,67	4,63	5,92	2,67	2,54	1,25	1,44	0,34
Ks40		4,5	6,11	3,51	2,19	1,89	2,28	4,04	5,05	2,07	2,15	1,21	1,31	0,37
Ks35	Сеногда	5	6,37	3,81	2,67	2,18	2,77	4,47	5,46	1,89	2,19	1,07	1,31	0,29
Ks36		4,5	6,29	3,67	2,85	2,01	2,9	4,4	5,41	1,95	2,17	1,03	1,14	0,28
Ks37		4,5	8,62	4,44	2,95	2,61	3,13	5,53	6,99	3,07	2,9	1,7	1,88	0,39
Ks81		5,5	8,37	4,39	2,67	2,53	2,95	5,31	6,57	3,08	2,86	1,63	1,7	0,45
Ks82		5,5	8,21	4,64	2,7	2,76	2,86	5,25	6,57	2,98	2,94	1,54	1,62	0,45
Ks83		4,5	6,06	3,65	2,12	2,06	2,47	4,04	5,08	2	2,35	1,06	1,32	0,42

Продолжение таблицы 5.

ID	Станция	Кол-во оборот	H	W	ah	aw	al	ho	ht	hz	w1	h1	l1	a1
Ks20	Ая	5	8,32	4,41	3,16	2,55	3,33	5,19	6,57	3,14	2,71	1,42	1,71	0,38
Ks24		5	7,73	4,08	3,06	2,39	3,12	5,12	6,26	2,59	2,43	1,24	1,56	0,32
KsX1	Бабушкин	3,75	9,7	5,17	3,6	3,1	3,67	6,57	8,4	3,1	3,37	1,9	2,2	0,41
Ks52	Голоустное	4	6,47	3,83	2,81	2,27	2,95	4,27	5,62	1,73	2,14	1,02	1,24	0,28
Ks53		4,5	6,7	3,94	2,74	2,33	3,07	4,74	5,72	1,98	2,28	1,15	1,32	0,31
Ks54		3,5	7,11	4,01	2,94	2,48	3,24	5,11	6,16	1,95	2,43	1,29	1,47	0,37
Ks48		4,5	7,08	3,95	2,82	2,29	3,01	5,03	6,05	2	2,31	1,1	1,31	0,32
Ks51		3,7	5,86	3,56	2,54	1,95	2,64	4,31	5,18	1,57	1,96	1	1,16	0,29
Ks85	Култук	5	6,71	3,4	2,22	1,91	2,56	4,29	5,49	2,4	2,29	1,26	1,39	0,36
Ks86		4,5	6,18	3,49	2,16	2,03	2,37	4,24	5,15	1,94	2,11	1,13	1,13	0,28
Ks23	Листвянка	3,5	7	4,28	2,95	2,48	3,15	4,98	6,03	2,13	2,3	1,12	1,43	0,28
Ks64	Ольхонские ворота	3,5	7,25	4,13	2,83	2,35	3,19	5,17	6,38	2,04	2,65	1,56	1,61	0,44
Ks66		3,5	7,67	4,51	2,91	2,54	3,45	5,31	6,64	2,4	2,79	1,49	1,73	0,41
Ks67		3,2	7,04	4,16	2,84	2,47	3,1	4,95	6,25	2,09	2,53	1,38	1,53	0,34
Ks58		4	6,61	3,48	2,55	2,08	2,58	4,49	5,54	2,14	2,18	1,19	1,32	0,37
Ks73	Утулик	4,1	9,33	4,75	3,09	2,7	3,23	6,01	7,5	3,36	3,21	1,8	2,04	0,56
Ks79		3,2	7,48	4,31	2,93	2,58	3,18	5,19	6,59	2,27	2,82	1,49	1,56	0,46
Ks19		4	5,45	2,87	2,18	1,68	2,12	3,83	4,61	1,62	1,82	0,86	1,19	0,25

Таблица 6. Проанализированные моллюски *Korotnewia semenkewitschi*

Станция сбора	Количество проанализированных особей		
	Морфометрия	Интрон ATP $\alpha$	CO1
<b>Северная котловина</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>1</b>
б. Аяя	4	1	—
м. Немнянка	4	5	1
б. Сеногда	6	5	—
б. Фролиха	1	1	—
<b>Центральная котловина</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>6</b>
б. Ая	2	1	—
Баргузинский залив	2	2	2
м. Боро-Елга	—	2	2
Пр.Ольхонские ворота	4	5	2
<b>Южная котловина</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
м. Бабушкин	—	1	—
Ок. п. Б. Голоустное	5	2	—
Ок. п. Листвянки	1	1	1
Залив Култук	2	1	1
Ок. п. Утулик	2	2	1



Таблица 7. Районы сбора и количество расшифрованных нуклеотидных последовательностей по фрагменту интрона гена  $\alpha$ -субъединицы АТФ-синтазы и фрагмента гена CO1 полихет рода *Manayunkia*.

Вид	Станция сбора материала	Количество последовательностей интрона	Количество последовательностей CO1
<i>M. baicalensis</i>	Малое Море	1	1
	Ок. г. Нижнеангарск	1	1
	Ок. пос. Б. Голоустное	4	-
	Ок. пос. Хакусы	1	1
<i>M. godlewskii</i>	Малое Море	7	7
	Ок. пос. Б. Коты	3	-
	Падь Жилище	3	2
	Падь Сенная	3	-
<i>M. zenkewitschii</i>	Б. Варначка	1	-
	Муринская банка	1	-
	О-в Б. Ушканий	3	-
	Ок. пос. Хакусы	1	1
<i>M. sp.</i>	Оз. Баунт	2	-
<i>M. sp.</i>	Оз. Глухое (Магаданская обл.)	2	-